EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR AUSSCHEIDUNG VON ESCHERICHIA COLI K99-ANTIKÖRPERN ÜBER DIE MILCH VON VACCINIERTEN UND NICHT VACCINIERTEN KÜHEN

Franz-Xaver Gmelch

Diss München
1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544319_0013

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR AUSSCHEIDUNG VON ESCHERICHIA COLI K99 - ANTIKÖRPERN ÜBER DIE MILCH VON VACCINIERTEN UND NICHT VACCINIERTEN KÜHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Franz-Xaver Gmelch
aus
Dietfurt

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. K. Walser

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	EINLEITUNG	1
B	SCHRIFTTUM	2
	1. Definition und Charakterisierung der "adhäsiven" Fimbrien von E.coli-Bakterien	2
	2. Eigenschaften der adhäsiven, wirtsspezifischen Fimbrien von E.coli-Bakterien	3
	3. Das K99-Antigen	4
	3.1. Morphologie und Zusammensetzung	4
	3.2. Herstellung	5
	3.3. Haftmechanismus	6
	3.4. Nachweis	7
	3.5. Immunisierung	8
C	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	16
	1. Material und Methoden	16
	1.1. Versuchstiere	16
	1.2. K99-Antigenherstellung	16
	1.3. Hämagglutination	17
	1.4. Impfstoff und Immunisierung	17
	1.5. Kolostrum- und Milchproben	18
	1.6. Serumproben	19
	1.7. Kotproben	19

Seite

1.8. Nachweis der K99-Antikörper mit dem ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 19

1.8.1. Antigen 19

1.8.2. Immunserum 20

1.8.3. Durchführung des Testes 20

1.9. Nachweis von E.coli K99-Stämmen Im Kot mit dem ELISA 21

1.10. Auswertung der Ergebnisse 22

2. Ergebnisse 24

2.1. Nachweis von E.coli K99-Antikörpern in Milchproben von vaccinierten und nicht vaccinierten Kühen 24

2.2. Nachweis von E.coli K99-Keimen in Kotproben von Kälbern mit Durchfall, die von vaccinierten Kühen stammten 28

2.3. Nachweis von E.coli K99-Antikörpern in Sera von geimpften Kühen und ihren Kälbern 28

D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 38

E ZUSAMMENFASSUNG 44

SUMMARY

F LITERATURVERZEICHNIS 48

G LEBENSLAUF 67

A EINLEITUNG

Enterotoxische E.coli-Keime (ETEC) mit dem Fimbrienantigen K99 sind zusammen mit Rota- und Coronaviren die wichtigsten Erreger von neonatalen Durchfällen beim Kalb. Seit man weiß, daß spezifische Milchantikörper neugeborene Tiere vor Darminfektionen schützen können, konzentriert sich heute die Bekämpfung dieser Infektionskrankheiten wieder mehr und mehr auf die Muttertierimpfung (Gaastra und de Graaf, 1982, Acres et al., 1979, Haggard et al., 1982, B. Nagy, 1980).

Das Ziel der Muttertierimpfung gegen Durchfallerreger ist eine Verbesserung der laktogenen Immunität, d.h., eine Erhöhung der Milchantikörper und eine Verlängerung der Antikörperausscheidung über die Milch. Gegen die enterotoxischen E.coli-Infektionen des Kalbes hat sich die Immunisierung hochträchtiger Kühe mit einem K99-Antigen bewährt. Geimpfte Tiere hatten höhere K99-Antikörpertiter im Kolostrum und in der Milch als nicht geimpfte Kühe und die Kälber von geimpften Kühen waren an den ersten Lebenstagen gegen eine E.coli K99-Infektion geschützt (Acres et al., 1982, Haggard et al., 1982, Eichhorn et al., 1982, Snodgrass et al., 1982, B. Nagy, 1980).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirksamkeit verschiedener Muttertiervaccinen mit dem E.coli K99-Antigen bei hochträchtigen Kühen vergleichend untersucht werden. Im einzelnen wurden dazu der K99-Antikörpergehalt im Serum und in der Milch der ersten zwei Laktationswochen post partum bei vaccinierten und nicht vaccinierten Kühen mit dem ELISA bestimmt.

B SCHRIFTTUM

1. Definition und Charakterisierung der "adhäsiven" Fimbrien von E.coli-Bakterien

Die Anheftung an Epitheloberflächen spielt bei der Entstehung von bakteriellen Infektionen z.B. durch E.coli-Bakterien, Neisserien oder Streptokokken eine wichtige Rolle (Gaastra, de Graaf, 1982). Nur wenn Bakterien die Fähigkeit zur Anheftung besitzen, können sie Epitheloberflächen besiedeln und werden nicht durch Peristaltik, Sekret- und Nahrungsstrom weggeschwemmt. Die Anheftung ermöglichen Fimbrien oder Pili. Bei diesen Fimbrien handelt es sich um fadenförmige, proteinhaltige Anhängsel an der Bakterienzellwand. Die Fimbrien sind dünner und sehr viel zahlreicher als Geißeln und umgeben die Bakterienzelle peritrich als dichter Saum (Duguid et al., 1955, Brinton, 1965, Houwink u. Iterson, 1950, Orskov, 1975, Jones, 1977). Fimbrien sind nicht nur für die Anheftung der Bakterien wichtig. Neben "adhäsiven" Fimbrien können Bakterien auch Fimbrien für andere Funktionen besitzen wie z.B. "konjugative" Fimbrien, die die Übertragung von genetischer Information (DNS) zwischen Bakterienzellen ermöglichen (Smith u. Linggood, 1972, Van Embden et al., 1980, Brinton, 1965). Die "adhäsiven" Fimbrien der E.coli-Bakterien teilt man in "wirtsspezifische" und "nicht-wirtsspezifische" Fimbrien ein. Letztere besitzen viele E.coli-Stämme und zwar unabhängig davon, ob die Keime pathogen oder apathogen sind. Diese "nicht-wirtsspezifischen" Fimbrien werden als "Typ 1"-Fimbrien bezeichnet und ermöglichen es E.coli-Bakterien, sich an eukaryotische Zellen (z.B. Erythrozyten, Leukozyten oder Epithelzellen) anzuheften (Salit und Gotschlich, 1977, Korhonen et al., 1980, Blumenstock et al., 1982, Ofek u. Beachey, 1978, Orskov, 1975). Im Gegensatz dazu ist der Besitz von adhäsiven, wirtsspezifischen Fimbrien immer mit der Pathogenität gekoppelt, d.h., das Vorhandensein von adhäsiven wirtsspezifischen Fimbrien

ist neben der Eigenschaft der Toxinbildung ein wichtiger Virulenzfaktor für E.coli-Bakterien(Gaastra u. de Graaf, 1982). Einen Überblick über die bekannten adhäsiven Fimbrien bei E.coli-Bakterien, ihr Vorkommen und ihre wichtigsten Eigenschaften gibt Tabelle 1.

2. Eigenschaften der adhäsiven, wirtsspezifischen Fimbrien von E.coli-Bakterien

Adhäsive, wirtsspezifische Fimbrien sind bisher nur bei enterotoxinbildenden E.coli-Stämmen (ETEC) beschrieben worden (Ueda u. Terakado, 1982, Rycke u. Roux 1982, Nagy u. Nagy, 1982, Duguid u. Old, 1980, de Graaf et al. 1980). E.coli-Stämme mit diesen Fimbrien können sich lediglich an das Darmepithel einer sehr begrenzten Zahl von Tierarten (Wirten) anheften und agglutinieren nur Erythrozyten von bestimmten Tierarten. Diese hämagglutinierende Eigenschaft ist nicht durch Mannose blockierbar (Orskov et al., 1961, Orskov et al., 1975, de Graaf et al., 1982, Burrows et al., 1976, Isaacson et al., 1980) (vgl. Tab. 1).

E.coli-Stämme mit Fimbrien produzieren entweder hitzestabiles (ST) oder hitzelabiles (LT) oder beide Arten (ST und LT) von Enterotoxin (vgl. Tab. 2) (Guinee u. Jansen, 1979, Isaacson et al., 1978, Nagy, 1980). Sowohl die Ausbildung der wirtsspezifischen, adhäsiven Fimbrien, als auch die Produktion von Enterotoxin ist plasmidgebunden. Im allgemeinen sind beide Eigenschaften an getrennte Plasmide gebunden (de Graaf und Mooi, 1982, de Graaf und Roorda, 1982). Es gibt jedoch Hinweise, daß bei einigen E.coli-Stämmen die K99-Produktion und die Enterotoxinbildung an ein Plasmid gekoppelt sind (Gaastra und de Graaf, 1982, So et al., 1976)

Die adhäsiven, wirtsspezifischen Fimbrien der verschiedenen E.coli-Stämme besitzen eine unterschiedliche Antigenstruktur. Die Bezeichnung dieser Fimbrienantigene ist derzeit noch uneinheitlich. Sie werden als K-(Kapsel), P-(Pilus), F-(Fimbrie) oder CFA- (colonization factor antigen) Antigen geführt (vgl. Tab. 1). In der Zukunft sollen sie einheitlich als F-Antigene angesprochen werden (Duguid et al., 1955, Ottow, 1975, Kehoe et al., 1982).

Als erstes Antigen der adhäsiven, wirtsspezifischen Fimbrien wurde 1961 das K88-Antigen bei enterotoxischen Stämmen (ETEC) beschrieben, die von Ferkeln mit Ödemkrankheit oder Diarrhoe isoliert worden waren (Orskov et al., 1961). 1972 entdeckten Wray und Sojka, daß viele für das Kalb und Lamm enteropathogene E.coli-Stämme ein gemeinsames Antigen besaßen. Dieses Antigen wurde anfangs als "common antigen" (K_{CO}) bezeichnet (Smith und Linggood, 1972). Später konnte dieses Antigen dann als Fimbrienantigen identifiziert werden und wurde mit K99 benannt (Orskov et al., 1975). In den letzten Jahren fand man noch weitere Antigene der adhäsiven, wirtsspezifischen Fimbrien, und zwar beim Schwein das 987 P-Antigen, beim Kalb das F41-Antigen und beim Menschen das CFA I - und das CFA II-Antigen. Bovine ETEC können 2 Fimbrienantigene besitzen, nämlich das K99- und das F41-Antigen (Fusco et al., 1978, de Graaf und Roorda, 1982, Evans und Evans, 1978, Evans et al., 1979).

3. Das K99-Antigen

3.1. Morphologie und Zusammensetzung

Beim K99-Antigen handelt es sich um ein kationisches Hämagglutinin, das aus identischen Proteinuntereinheiten besteht. Es hat ein Molekulargewicht von 18500 (Morris et al., 1980, de Graaf et al., 1981, Chanter, 1982, Morris et al., 1978).

Aminosäurenanalysen zeigen einen überwiegenden Anteil von Aminosäuren mit apolaren Seitenketten und das Vorhandensein von Cystein. Der isoelektrische Punkt des gereinigten K99-Antigens liegt bei 9.75 (de Graaf et al., 1981). In elektronenoptischen Untersuchungen stellt sich das K99-Antigen als Faden mit helikaler Struktur und einem Durchmesser von 4,8 nm dar (de Graaf et al., 1981).

3.2. Herstellung

Die K99-Produktion ist vom E.coli-Stamm, der Zusammensetzung des Nährmediums und der Bebrütungstemperatur abhängig (Gaastra und de Graaf, 1982). Von den verschiedenen getesteten E.coli K99-Stämmen produzieren Stämme aus der O-Gruppe 101 deutlich mehr K99-Antigen als Stämme aus den O-Gruppen 8,9 oder 20 (de Graaf et al., 1980). Noch stärker als der verwendete E.coli-Stamm wirkt sich die Bebrütungstemperatur auf die K99-Produktion aus. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich wird, ist die Produktion bei 37^{o} C am günstigsten. Bei 18^{o} C wird die K99-Produktion vollkommen unterdrückt (Gaastra und de Graaf, 1982).

In komplexen Medien, wie z.B. Nährbouillon, wird die Produktion des K99-Antigens unterdrückt. Für eine optimale K99-Expression sind leicht salzsaure Medien (de Graaf et al., 1980), Medien mit Trypticase (Isaacson, 1977) oder synthetische Medien mit Glukose und Zitronensäure als einzige organische Bestandteile (Francis et al., 1982) geeignet. In bezug auf die Glukose muß man aber bedenken, daß es glukoseabhängige und glukoseunabhängige E.coli-Stämme gibt. Bei den einen wird die K99-Produktion durch den Zusatz von Glukose ins Medium unterstützt, bei den anderen dagegen unterdrückt (Contrepois et al., 1982, de Graaf et al., 1980, Giradeau et al., 1982). Wichtig ist auch, daß das Medium kein Alanin enthält, weil Alanin spezifisch die K99-Synthese unterdrückt (Giradeau et al., 1982, Contrepois et al., 1982, de Graaf et al., 1980).

Für die Anzüchtung auf festen Nährböden, z.B. zum serologischen Nachweis, verwendet man gepufferte, synthetische Medien, wie z.B. das Minca-Medium nach Guinee und Jansen (1976 und 1977), die die Kapselbildung der E.coli-Stämme unterdrücken, weil sie weniger Aminosäuren und Kohlenstoff enthalten als die üblichen Nährmedien. Außerdem wird in belüfteten Kulturen mehr K99-Antigen gebildet als in stationären Kulturen (Isaacson, 1980).

Die Trennung des K99-Antigens von der Bakterienzelle kann durch schonendes Erhitzen, z.B. 30 Minuten bei 60° C (Morris et al., 1977), oder durch Mixen der Bakteriensuspension geschehen (Isaacson, 1977 u. 1978). Die weitere Aufbereitung erfolgt durch bekannte Methoden wie Zentrifugation, Ammoniumsulfatpräzipitation, Säulenchromatographie oder Gelfiltration (Isaacson, 1978, de Graaf et al., 1981, Morris et al., 1977).

3.3. Haftmechanismus

Adhäsive, wirtsspezifische Fimbrien befähigen ETEC, sich im Dünndarm anzuheften und zu vermehren - in einem Darmbereich, wo normalerweise sehr wenig Bakterien sind (Smith u. Halls, 1967, Smith u. Linggood, 1972, Hadad u. Gyles, 1982, Isaacson et al., 1978). Die mit Fimbrien ausgestatteten E.coli-Bakterien findet man von der Zottenspitze bis zur Basis, dagegen die anderen Bakterien nur an der Spitze oder im Lumen. E.coli K99-Bakterien haften sich am stärksten im hinteren Bereich des Dünndarms an (Isaacson et al., 1978, Smith u. Huggins, 1978). E.coli K99-Keime heften sich nur an Darmepithelzellen von Kalb, Ferkel und Lamm an, wobei eine altersabhängige Resistenz der Epithelzellrezeptoren gegenüber den K99-Fimbrien besteht (Snodgrass et al., 1982). Eine optimale Anheftung wird nur bei den Darmepithelzellen neugeborener Tiere (1.-2. Lebenstag) nachgewiesen (Rycke et al., 1981, Smith u. Halls, 1967, Runnels et al., 1980). Als Rezeptoren für die K99-Fimbrien dienen die Glykolipide und Glykoproteine der Epi-

thelzelle (Chan et al., 1982, Pearson und Logan, 1982). Obwohl es keinen Zweifel mehr gibt, daß die adhäsiven, wirtsspezifischen Fimbrien die Anheftung ermöglichen, ist über den genauen Ablauf des Haftmechanismus noch nicht sehr viel bekannt. Neueste Untersuchungen weisen auf eine Helferrolle der Rotaviren hin. E.coli-Keime haften sehr viel besser an der Schleimhaut, wenn vorher eine Rotavirusinfektion gesetzt wurde (Heß et al.: Synergism in experimental mixed infections of newborn colostrum-deprived calves with bovine rotavirus and enterotoxigenic E.coli; einger. zur Publ.).

Normalerweise bestehen zwischen der Epithel- und der Bakterienzelle abstoßende elektrostatische Kräfte, da beide Zelloberflächen negativ geladen sind. Mit Hilfe der adhäsiven Fimbrien können ETEC diese Kräfte überwinden. Dabei spielen die durch den hohen Anteil apolarer Aminosäuren vorhandenen hydrophoben Eigenschaften der Fimbrien eine große Rolle. Adhäsine mit hydrophoben Eigenschaften bewirken eine Reduktion des Oberflächenpotentials durch das Verschleiern der Ladungen des Polysaccharid-Anteils der Bakterienkapsel bzw. des Lipopolysaccharid-Anteils der Bakterienzellwand und begünstigen dadurch eine Anheftung (Rutter und Vincent, 1980, Smyth et al., 1978, Wadström et al., 1979, Wadström et al., 1980).

3.4. Nachweis

Der Nachweis des K99-Antigens spielt in der bakteriologischen Diagnostik eine große Rolle. Da in bisherigen Untersuchungen fast alle enterotoxinbildenden E.coli-Stämme vom Kalb das K99-Antigen besaßen, kann allein durch den Nachweis des K99-Antigens eine Aussage über die Enterotoxizität des entsprechenden E.coli-Stammes getroffen werden (Guinee und Jansen, 1979, Isaacson et al., 1980, Rycke und Roux, 1981, Myers und Guinee, 1976, Nagy und Nagy, 1982).

Dies ist vor allem interessant, weil der Nachweis des Enterotoxins sehr aufwendig ist.

Der Nachweis von E.coli-Stämmen in Kotproben kann entweder indirekt über die Anzüchtung oder direkt mit dem ELISA erfolgen. Für die Anzüchtung eignen sich die für die Isolierung von Enterobakterien normalerweise verwendeten Medien nicht. Als optimal für den E.coli K99-Nachweis erwies sich die Anzüchtung von Kotproben auf normalem Minca-Agar oder Minca-Agar + Isovitalex (1 %) (Guinee et al., 1977). Die optimale Bebrütungszeit beträgt bei normalem Minca-Agar 6 - 8 Stunden und beim Minca-Agar + Isovitalex 20 - 24 Stunden. Mit Hilfe der Objektträgeragglutination mit spezifischen K99-Immunsera läßt sich dann direkt das Vorhandensein von K99-Antigen bei den auf Minca-Agar angezüchteten E.coli-Stämmen nachweisen (Baljer und Bachmann, 1980, Guinee et al., 1976, Moon et al., 1977). Zu beachten ist, daß sich Subkultivierungen negativ auf den Nachweis auswirken, da das K99-Plasmid bei den Passagen verlorengehen kann (Guinee et al., 1977). Sehr viel eleganter ist der Nachweis des K99-Antigens bzw. der E.coli K99-Stämme mit dem ELISA. Bei diesem Test kann ohne vorherige Anzüchtung ein E.coli K99-Keim direkt in der Faecesprobe identifiziert werden (de Graaf et al., 1981, Engvall und Perlmann, 1972, Ellens, Leeuw und Rozemond, 1978).

3.5. Immunisierung

Nachdem man die Bedeutung des K99-Antigens für die Pathogenität von E.coli-Stämmen erkannt hatte, war es naheliegend, mit diesem Antigen Immunisierungsversuche vorzunehmen (Morgan et al., 1978, Acres et al., 1979, Isaacson et al., 1981, Nagy 1980). Das K99-Antigen erbrachte gegenüber anderen E.coli-Antigenen den Vorteil, daß die meisten bovinen enterotoxischen E.coli-Stämme dieses Antigen besaßen. Das K99-Antigen stellte sich somit als serotypübergreifend dar (Morgan et al., 1978, Acres et al., 1979, Gaastra u. de Graaf 1982, Desmettre et al., 1982).

Alle Immunisierungsversuche bezogen sich auf das Muttertier. Sie hatten das Ziel, bei laktierenden Kühen die Milchantikörpersekretion zu stimulieren. Die mit der Milch übertragenen K99-Antikörper schützten dann das Kalb vor ETEC-Infektionen (Newmann et al., 1973, Morgan et al., 1978, Isaacson et al., 1981, Acres et al., 1979, Acres et al., 1982, Leresche und Penseyres, Nagy, 1980, Desmettre et al., 1982 Haggard et al., 1982, Snodgrass et al., 1982, Eichhorn et al., 1982, Moon und Donald, 1983, Gaastra und de Graaf, 1982, Sojka et al., 1978, Morris et al., 1980).

Die bisherigen Impfungen wurden mit einer Ausnahme parenteral durchgeführt. Die orale Vaccination allein brachte kein befriedigendes Ergebnis, jedoch zeigte sich nach der parenteralen Boosterung bei den mit lebendem Bakterienmaterial oral erstimmunisierten Tieren ein weitaus höherer K99-Antikörpertiter im Serum und in der Milch als bei den Tieren, die mit inaktivierten Bakterien nur parenteral immunisiert worden waren (Moon und Donald, 1983). Durch die Impfung von trächtigen Muttertieren mit K99-Antigen konnte die Ausscheidung von K99-Antikörpern über die Kolostralmilch soweit erhöht werden, daß neugeborene Tiere, die Kolostralmilch aufnahmen, gegen eine experimentelle Infektion mit enterotoxischen E.coli K99-Keimen geschützt waren. Das beste Ergebnis ließ sich mit einer zweimaligen Impfung im letzten Trächtigkeitsdrittel erzielen, aber nur unter der Voraussetzung, daß die Kühe bereits einen natürlichen Erstkontakt mit dem K99-Antigen hatten (Moon und Donald, 1983). Als Impftermine für die zweimalige intramuskuläre oder subkutane Grundimmunisierung wurden 4 bis 8 Wochen und wenige Tage vor dem errechneten Geburtstermin vorgeschlagen. Nach der zweimaligen Grundimmunisierung reichte bei den nächsten Trächtigkeiten eine einmalige Boosterimpfung aus, wobei man im Falle der jährlichen Revaccination die höchsten Antikörpertiter in der Kolostralmilch mit einer Impfung 3 Wochen vor dem Geburtstermin erzielte (Desmettre et al., 1982, Haggard et al., 1982).

Die ersten Immunisierungsversuche wurden mit inaktiviertem Vollantigen vorgenommen, d.h., man applizierte mit Formalin inaktivierte und mit Adjuvantien gemischte E.coli K99-Stämme (Newmann et al., 1973, Acres et al., 1979). Die Keimzahl pro Dosis lag bei 1 mal 10^{11} inaktivierten Keimen. Neben dem Vollantigen diente auch gereinigtes, von der Bakterienzelle getrenntes K99-Antigen zur Impfung (Morgan et al., 1978, Isaacson et al., 1981, Nagy, 1980). In vergleichenden Untersuchungen mit einer Vaccine aus gereinigtem K99-Antigen (10 mg K99-Antigen) und einer Vaccine aus formalininaktivierten E.coli-Keimen (ca. 10^{11}) war die Vaccine aus gereinigtem Antigen etwas besser und zwar sowohl in Hinblick auf die Kolostralmilchtiter, als auch in bezug auf das klinische Ergebnis nach oraler Infektion der neugeborenen Kälber mit drei bis fünf mal 10^{11} E.coli K99-Keimen (Acres et al., 1979). Die Zukunft bei der Herstellung von Fimbrienvaccinen liegt sicher in der Gentechnik. Erste Versuche zur gentechnischen Produktion von K99-Antigen sind erfolgreich verlaufen.

Einen geringeren K99-Antikörpertiter in der Kolostralmilch und damit auch einen unbefriedigenden Schutz der experimentell infizierten Kälber erreichten Acres et al., (1979) nach Verwendung einer Ganzzellvaccine, die aus sechs verschiedenen bovinen ETEC-Stämmen hergestellt worden war (60 mg Zellmaterial pro Impfdosis) und die kein Adjuvans enthielt. Ein aus acht verschiedenen bovinen ETEC-Stämmen hergestellter inaktivierter Adsorbatimpfstoff ($Al(OH)_3$) stimulierte dagegen nach zweimaliger Impfung (sechs und vier Wochen ante partum) im Kolostrum und im Serum einen hohen K99-Antikörpertiter (Leresche und Penseyres, 1982).

Da Mischinfektionen mit ETEC, Rotavirus und häufig auch Coronavirus als wichtigste infektiöse Ursachen neonataler Kälberdurchfälle erkannt wurden, war es logisch, Kombinationsvaccinen gegen diese Erreger zu entwickeln (Woode, 1981,

Baljer und Bachmann, 1980, Eichhorn et al., 1982, Snodgrass et al., 1982). In jüngster Zeit wurden wirksame Kombinationsvaccinen gegen Rotavirus und K99-besitzende ETEC hergestellt, ohne eine Abschwächung der Wirksamkeit bei den einzelnen Komponenten festzustellen (Eichhorn et al., 1982, Snodgrass et al., 1982).

Die meisten bisherigen Untersuchungen beschränkten sich in der Wirksamkeitskontrolle auf den Nachweis der Kolostrumantikörper oder auf den Infektionsschutz beim neugeborenen Kalb. In einer einzigen Untersuchung wurde der zeitliche Verlauf der K99-Antigenausscheidung in der Milch bei vaccinierten Kühen über einen längeren Zeitraum verfolgt (Snodgrass et al., 1982). Bei den Vaccinen kamen entweder Aluminiumhydroxid oder Öl als Adjuvantien zur Verwendung. Der Aluminiumhydroxidimpfstoff wurde zweimal (sechs Wochen und zwei Wochen ante partum) und die ölige Vaccine einmal intramuskulär verimpft. Ein Teil der Tiere war bereits ein Jahr zuvor immunisiert worden. Bei allen geimpften Tieren ließ sich im Kolostrum ein deutlicher K99-Antikörpertiteranstieg nachweisen. Bei der öligen Vaccine wurde noch am 14. Laktationstag post partum in der Milch ein erhöhter K99-Antikörpergehalt gefunden, während bei der Aluminiumhydroxidvaccine am 7. Laktationstag in der Milch keine K99-Antikörper mehr nachweisbar waren.

Einige Impfversuche mit K99-Antigen wurden beim Schwein vorgenommen (Morgan et al., 1978, Isaacson et al., 1981). Die Vaccine setzte sich aus gereinigtem K99-Antigen (0,9 mg Protein/ml) zusammen und mußte zweimal subkutan verabreicht werden (25 und 12 Tage ante partum). Der Wirksamkeitsnachweis stützte sich auf die K99-Antikörperbestimmung im Kolostrum und die Belastungsinfektion bei Ferkeln geimpfter Sauen. Die Muttersauen hatten nach der Impfung hohe K99-Antikörpertiter im Kolostrum. Während von den Ferkeln der Kontrollgruppe 15 von 35 nach der oralen Infektion mit 10^{10} Keimen

an Durchfall starben, überlebten alle Ferkel der geimpften Muttertiere die experimentelle Infektion.

Über gute Erfolge bei der Bekämpfung von ETEC-Diarrhoen der Lämmer nach einer Muttertiervaccination bei Schafen berichteten Sojka et al., (1978) und Morris et al., (1980). Für die Erstimpfung verwendeten sie gereinigtes K99-Antigen mit Freund'schem inkomplettem Adjuvans und für die Zweitimmunisierung reines K99-Antigen. Sowohl im Serum als auch im Kolostrum der geimpften Schafe wurde ein deutlicher K99-Antikörpertiteranstieg gemessen.

Eine wichtige Rolle für die Wirksamkeit des Impfstoffes spielte offensichtlich das Adjuvans (Eichhorn, 1981, Edelmann, 1980). In den verschiedenen Impfstoffen waren entweder Al $(OH)_3$ (Leresche und Penseyres, 1982), inkomplettes Freund'sches Adjuvans (Newmann et al., 1973, Sojka et al., 1978, Morris et al., 1980), ölige Suspensionen (Snodgrass et al., 1982, Eichhorn et al., 1982), Aluminiumhydrogel (Acres et al., 1979, Acres et al., 1982, Haggard et al., 1982, Snodgrass et al., 1982), oder Aluminiumhydroxid mit Saponinen (Leresche und Penseyres, 1982) enthalten. Nur nach Impfung mit dem inkompletten Freund'schen Adjuvans kam es zu lokalen Schwellungen und allgemeinen Unverträglichkeitsreaktionen. Bei der Impfung mit einer gereinigten K99-Antigen-Vaccine ohne Adjuvans erkrankten und starben nach experimenteller Infektion mit einem ETEC K99-Stamm zwei von sechs Kälbern (Contrepois et al., 1982). Bei Impfung mit einem K99-Impfstoff, der Aluminiumgel als Adjuvans enthielt, waren dagegen alle Kälber geschützt (Chanter, 1982). Die beste Wirksamkeit hatten Vaccinen mit Öl oder Aluminiumhydroxid (Eichhorn et al., 1982, Snodgrass et al., 1982, Leresche und Penseyres, 1982).

Tab. 1: Überblick über die Eigenschaften adhäsiver E.coli-Fimbrien (mod. nach Gaastra u. de Graaf)

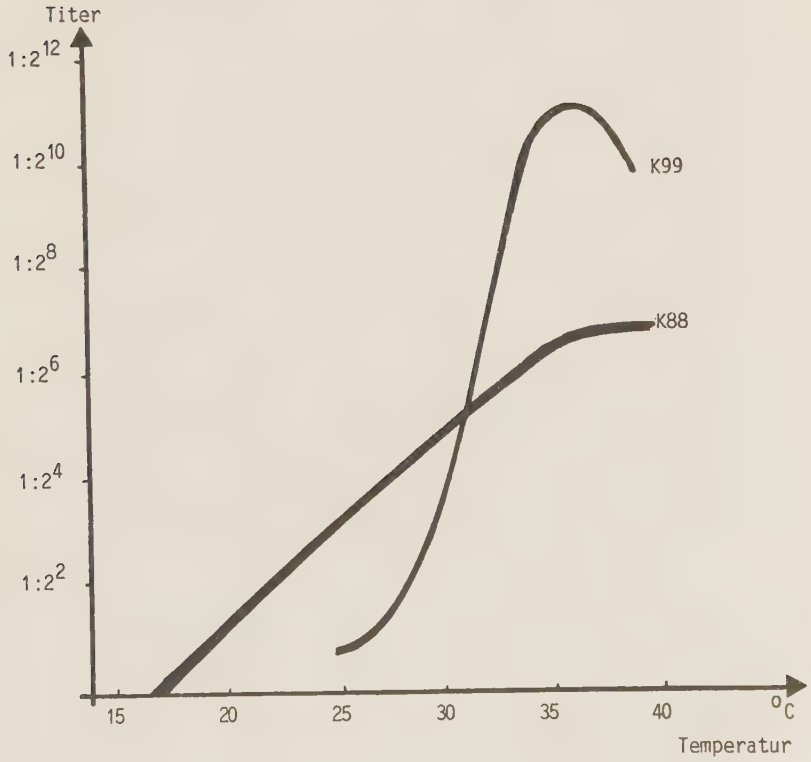
Fimbrienart (adhäsiv)	Vorkommen		Mannose resistente Hämagglutination	agglutinierende Blutkörperchen	Produktion bei 18° C	Durchmesser (nm)	Molekulargewicht
	Tierart	O-Serogruppe					
K 88	Schwein	08,045,0138, 0141,0147, 0149,0157	ja	Meerschweinch. Küken	nein	2,1	27.540
987 P	Schwein	09, 020, 0141	nein	-	nein	7	20.000
K 99	Rind, Schaf	08,09,020,0101	ja	Pferd Schaf	nein	4,8	18.500
	Schwein	064, 0101					
F 41	Rind Schwein	09, 0101	ja	Mensch Meerschw. Pferd Schaf	nein	3,2	29.500
CFA/I	Mensch	015, 025 063, 078	ja	Mensch Rind Küken	nein	3,2	15.058
CFA/II	Mensch	06, 08	ja	Rind Küken	nein	3,2	13.000
Typ 1	spezies-unabhängig	O-Serogruppen-unabhängig	nein	-	ja	7	17.099

Tab. 2: Zusammenhang zwischen Anheftungsfaktor und Enterotoxin-Produktion (nach Gaastra und de Graaf)

Anheftungs-faktor	Enterotoxin[1)]		
	ST	LT	ST + LT
K88	+	+	+
987P	+	-	-
K99	+	-	-
F41	+	-	-
CFA/I	+	+	+
CFA/II	-	-	+

1) ST = thermostabil
LT = thermolabil

Abb. 1: Temperatur-abhängige Produktion von K99- und K88-Anheftungsfaktoren (Titer gemessen im ELISA) (nach Gaastra und de Graaf)



C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1. Versuchstiere

Von 1980 bis 1983 wurden Milchproben von insgesamt 42 nicht geimpften und 70 geimpften Kühen der Rassen Deutsches Fleckvieh, Braunvieh und Schwarzbunt untersucht. Die Tiere standen alle in Beständen Süddeutschlands. Von 11 Kühen und ihren Kälbern wurden im gleichen Zeitraum zusätzlich Serumproben untersucht.

1.2. K99-Antigenherstellung

Das K99-Antigen wurde in Anlehnung an die Methode von Isaacson (1977) hergestellt. Dazu wurden 0,1 ml einer 18-stündigen Bouillonkultur (Standard I Medium, Merck) des E.coli-Referenzstammes O 101:K99 (B 41)[1)] auf einer Minca-Platte nach Guinee (1977) ausgespatelt. Nach 18-stündiger Bebrütung bei 37° C wurde der Bakterienrasen von der dicht bewachsenen Minca-Platte mit 5 ml phys. NaCl-Lösung abgeschwemmt. Die Bakterienabschwemmung wurde anschließend mit einem Sorvall-Omnimixer im Eisbad gemixt (dreimal je acht Minuten bei Stufe 4 und zweimal je drei Minuten bei Stufe 8) und danach 40 Minuten bei 17000 UpM[2)]/4° C zentrifugiert. Der Überstand enthielt das K99-Antigen.

Der K99-Antigengehalt wurde mit Hilfe der Hämagglutination bestimmt. In der Regel enthielt 1 ml des Überstandes 512 hämagglutinierende Einheiten.

1) Wir danken Dr. Orskov vom Statens Serum Institut, Kopenhagen, für die Überlassung des Stammes

2) HIGH SPEED 18, Fa. MSE

1.3. Hämagglutination

Die Hämagglutination zum Nachweis des K99-Antigens bzw. zur Bestimmung der K99-Antigen-Konzentration wurde mit Pferdeerythrozyten durchgeführt. Die Erythrozyten wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend auf eine Konzentration von 3 % eingestellt. Der Erythrozytenlösung wurde vor der Verwendung 1 % Mannose zugesetzt.

Zur Durchführung des Testes wurde das K99-Antigen mit PBS verdünnt und zu jeder Verdünnungsstufe die gleiche Menge einer 3 %igen Pferdeerythrozytenlösung dazugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde die Reaktion 24 Stunden bei 8^{o} C bebrütet. Die Ablesung erfolgte mit bloßem Auge.

1.4. Impfstoff und Immunisierung

Zur Immunisierung diente ein Kombinationsimpfstoff, der K99-Antigen, inaktiviertes Rotavirus und verschiedene Adjuvantien enthielt. Die Impfdosis beinhaltete 512 hämagglutinierende Einheiten K99-Antigen und 4 ml mit Formalin inaktivierte Rotaviren (Infektionstiter $10^{6.5}$ KID_{50}/ml). Das Impfvolumen betrug 5 ml pro Tier. Die Immunisierung erfolgte zweimal, einmal 6 bis 8 Wochen vor dem errechneten Geburtstermin und ein zweitesmal kurz vor der Geburt. Folgende Adjuvantien kamen zur Anwendung: Aluminiumhydroxid ($Al(OH)_3$), ein Polymer (PD-Adjuvans), hochgereinigtes Saponin (Quil A) und Liposomen.

2 % $Al(OH)_3$ (Behringwerke, Marburg) wurde 1:8 in PBS verdünnt und nach Vermischen mit der Antigenlösung über Nacht bei 4^{o} C belassen.

Liposomen - sphärische Partikel aus Phospholipiden - wurden in Anlehnung an die von Gregoriadis et al. (1974) beschriebene Methode hergestellt. Für 100 ml Vaccine wurden 1 mM L-α-Lezithin, 0,286 mM Cholesterin und 0,143 mM

Dicetyl-Phosphat (Sigma, München) in 5 ml Chloroform gelöst. Durch N_2-Begasung wurde das Chloroform verdampft und so ein trockener Lipidfilm an der Gefäßwand hergestellt. Nach Zugabe der Antigenlösung wurde ca. 15 Minuten lang im Eisbad beschallt (3 Amp., 20 KHz).

Quil A[1] - ein hochgereinigtes Saponin (Dalsgaard, 1978), dem die immunpotenzierende Wirkung der Saponine erhalten, deren toxische Wirkung jedoch eliminiert ist - wurde in der Konzentration von 1 mg (in PBS gelöst und steril filtriert) pro Applikation verwendet.

Der Impfstoff der Behringwerke enthielt inaktiviertes Rota- und Parvovirus, 512 hämagglutinierende Einheiten K99-Antigen sowie Quil A und Aluminiumhydroxid als Adjuvans.

Als Placebo diente Kulturmedium.

1.5. Kolostrum- bzw. Milchproben

Insgesamt wurden 446 Milchproben auf den Gehalt an K99-Antikörpern untersucht. Die Milchproben wurden im Zeitraum 1 bis 14 Tage post partum entnommen. Die frisch gewonnenen Milchproben wurden bei -20° C bis zur Durchführung des Testes aufbewahrt. Vor der Antikörperbestimmung wurden die Proben zentrifugiert (17.000 UpM[2], 2 Stunden, 4° C). Anschließend wurde die Fettschicht entfernt, das Serum abgekippt und ein zweitesmal bei 3.000 UpM[3] 30 Minuten lang zentrifugiert. Eventuell noch vorhandene Fettschlieren wurden abgesaugt.

1) Quil A wurde dankenswerterweise von Prof. Dr.K. Dalsgaard, Lindholm Dänemark, zur Verfügung gestellt.

2) HIGH SPEED 18, Fa. MSE

3) Cryofuge 64, Fa. HERAEUS CHRIST

1.6. Serumproben

Die Sera von 11 geimpften Kühen und ihren Kälbern wurden auf den K99-Antikörpergehalt untersucht. Die Proben wurden an den Tagen 1, 7 und 14 entnommen, 1 Stunde bei 37° C inkubiert und bei 3.000 UpM[1)] zentrifugiert. Die Sera wurden bis zur Durchführung des Testes bei -20° C gelagert.

1.7. Kotproben

Von Kälbern, die von vaccinierten Kühen stammten und an Durchfall erkrankten, wurden Kotproben auf das Vorhandensein von K99-positiven E.coli-Stämmen untersucht. Die Kotproben wurden bis zur Durchführung des Testes bei -20° C eingefroren. Zum K99-Nachweis wurde 1 g der Kotprobe in 10 ml phys. NaCl-lsg. aufgeschwemmt.

1.8. Nachweis der K99-Antikörper mit dem ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

1.8.1. Antigen

Für die Plattenbeschichtung wurde das gleiche Antigen wie zur Immunisierung verwendet. Die Konzentration der K99-Antigenlösung betrug 512 hämagglutinierende Einheiten pro ml.

1) Cryofuge 64, Fa. HERAEUS CHRIST

1.8.2. Immunserum

Für die Immunserumherstellung wurden Kaninchen in 4-tägigem Abstand mit steigenden Dosen (0,1 bis 2 ml) der K99-Antigen-Suspension subkutan immunisiert. Nach einer sechsmaligen Immunisierung entbluteten wir die Tiere und gewannen das Serum, das wir anschließend mit O 101-Antigen solange absorbierten, bis keine O-Antikörper nachweisbar waren. Zum Vergleich verwendeten wir einen monoklonalen K99-Antikörper [1].

1.8.3. Durchführung des Testes

Der ELISA wurde im Mikroverfahren durchgeführt. Die Antigengebrauchsverdünnung in Karbonat/Bikarbonatpuffer (pH 9,6) lag bei 1:10. 0,1 ml der Antigenverdünnung wurde in die Vertiefungen der Flachbodenplatten (M 129 A, Flow Laboratories, Bonn) pipettiert. Die Platten wurden mit Tesafilm verschlossen, 3 Stunden bei 37° C inkubiert und anschließend im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit NaCl-Phosphatpuffer plus Tween (8 g NaCl + 0,2 g KH_2PO_4 + 2,9 g Na_2HPO_4 mal 12 H_2O + 0,2 g KCl pro 1 Liter Aqua dest. + 0,05 % Tween) wurden die Vertiefungen mit je 0,1 ml der in Zweier-Stufen mit NaCl-Phosphat-Tween verdünnten Sera beschickt. Zur Kontrolle wurden jeweils ein positives und ein negatives Serum mit untersucht. Nach einstündiger Bebrütung bei 37° C wurden die Platten viermal gewaschen und dann mit je 0,1 ml der Gebrauchsverdünnung des tierartspezifischen Konjugates (Verdünnung mit NaCl-Phosphat ohne Tween) beschickt. Es handelte sich dabei um Peroxidase-

[1] Ascitesflüssigkeit eines K99-Hybridoms (2BD4E4) wurde freundlicherweise von Dr. Gordowsky, Fa. Molecular Genetics, Minnetonka, Minn. USA zur Verfügung gestellt

anti-bovine Konjugat der Fa. Miles Yeda (Gebrauchsverdünnung 1:1000). Nach erneuter einstündiger Inkubation bei 37° C und viermaligem Waschen erfolgte die Zugabe von je 0,1 ml Substrat (0,5 g o-Phenylen-diamin der Fa. Sigma, München, + 4,67 g Zitronensäure + 9,15 g Na_2HPO_4 pro 1 l Aqua dest., unmittelbar vor Gebrauch Zugabe von 0,005 % H_2O_2). Die Platten wurden etwa 10 Minuten im Mikro-Shaker (Dynatech) geschüttelt und anschließend bei 450 nm im Multiscan-Photometer (Flow Laboratories, Bonn) gemessen.

1.9. Nachweis von E.coli K99-Stämmen im Kot mit dem ELISA

Der ELISA zum Nachweis von K99-positiven E.coli-Stämmen aus Kotproben wurde im Mikroverfahren in Anlehnung an die von Ellens, de Leeuw und Rozemond (1978) beschriebene Methode durchgeführt. 0,1 ml mit Ammoniumsulfat gefälltes K99-Globulin wurde in der ausgetesteten Gebrauchsverdünnung (1:80 mit Karbonat/Bikarbonatpuffer (pH 9.6)) in die Vertiefungen der Flachbodenplatten (M 129 A, Flow Laboratories, Bonn) pipettiert. Die Platten wurden mit Tesafilm verschlossen, 18 Stunden bei 37° C inkubiert und anschliessend bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit NaCl-Phosphatpuffer plus Tween (siehe 1.8.3.) erfolgte die Beschickung der Vertiefungen mit je 0,1 ml der in Zweier-Stufen mit NaCl-Phosphatpuffer verdünnten Kotproben. Als positive Kontrolle wurde eine E.coli O 101/K99-Keimsuspension mitgeführt. Anschließend wurden die Platten 180 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen wurden 0,1 ml eines monoklonalen K99-Antikörper-Peroxidase-Konjugates (Gebrauchsverdünnung 1:4000 mit NaCl-Phosphatpuffer ohne Tween) dazugegeben. Nach abermaligem einstündigen Bebrüten bei 37° C und viermaligem Waschen erfolgte schließlich die Zugabe von 0,1 ml Substrat

(siehe 1.8.3.) je Plattenvertiefung. Die Ablesung wurde nach 10-minütigem Schütteln im Schüttler direkt durch Messung der Extinktion mit dem Multiscan-Photometer (Flow Laboratories, Bonn) bei der Wellenlänge 450 nm durchgeführt. In Abb. 2 ist die Normalverteilungskurve mit einer K99-positiven Kotprobe dargestellt.

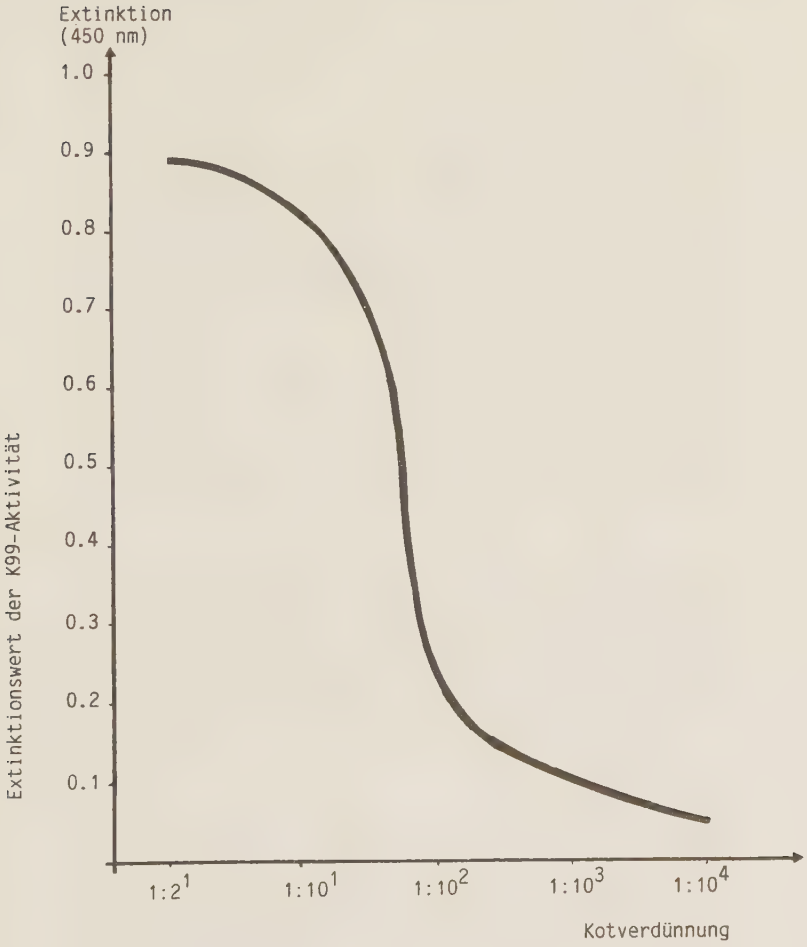
1.10. Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung basierte auf der bei 450 nm gemessenen optischen Dichte (Extinktionswert) der verschiedenen Serumverdünnungen. Als optische Dichte wurde der mit 10^3 multiplizierte Mittelwert aus der Summe der Extinktionswerte der Verdünnungsstufen 1:2, 1:16 und 1:128 errechnet.

Zum Vergleich wurde bei einem Teil der Seren der absolute Antikörpertiter errechnet. Als unterste Titergrenze galt der doppelte bei 450 nm gemessene Nullwert.

Zur Berechnung des geometrischen Mittelwertes (g) wurden die einzelnen Werte logarithmiert (natürlicher Logarithmus), aus den logarithmierten Werten wurde das aritmetrische Mittel (lnx) gebildet, dieses wurde delogarithmiert und als geometrisches Mittel eingesetzt. Zusätzlich ist in den Abbildungen und Tabellen als Streuungsmaß die Standardabweichung der logarithmierten Werte (s) angegeben.

Abb. 2: Normalverteilungskurve einer K99-positiven Kotprobe



2. Ergebnisse

2.1. Nachweis von E.coli K99-Antikörpern in Milchproben von vaccinierten und nicht vaccinierten Kühen

Bei 6 verschiedenen Tiergruppen wurde vergleichend mit dem ELISA der E.coli K99-Antikörpergehalt in der Milch gemessen. 4 Tiergruppen wurden vor der Laktation im letzten Trächtigkeitsdrittel mit verschiedenen von uns hergestellten Kombinationsvaccinen gegen Rotavirus und E.coli K99-Keimen immunisiert. Eine Gruppe wurde mit einem Impfstoff der Behringwerke AG und eine Tiergruppe mit einem Placebo-Impfstoff immunisiert. Im einzelnen wurde der Antikörpergehalt im Kolostrum bzw. in der Milch des 1. bis 7. und des 14. Laktationstages bestimmt. Einen Überblick über die mittleren Extinktionswerte der einzelnen Milchproben in den verschiedenen Tiergruppen gibt Tabelle 3. In der Abbildung 3 sind die Ergebnisse der verschiedenen Gruppen zusätzlich dargestellt.

Bei den nicht vaccinierten Kühen (Placebo-Gruppe) ließen sich nur am ersten (Kolostrum) und am zweiten Tag in den Milchproben deutliche K99-Antikörperaktivitäten zwischen 210 und 115 messen. Ab dem 3. Laktationstag lagen die Extinktionswerte im Bereich des unspezifischen "Background".

Bei den geimpften Tiergruppen waren höhere K99-Antikörperaktivitäten festzustellen als bei den Kontrolltieren. Innerhalb der geimpften Gruppen kam es aber in bezug auf die Höhe und Persistenz der Extinktionswerte zu deutlichen Unterschieden. Die höchsten K99-Antikörperaktivitäten im Kolostrum (mittlerer Extinktionswert größer 350) wies die Gruppe auf, die mit einem Impfstoff, der Quil A enthielt, vacciniert wurde. Nur unwesentlich niedriger lagen die Kolostrumwerte

bei der Gruppe, die mit dem Behring-Impfstoff immunisiert worden war. Am schwächsten, aber immer noch im positiven Bereich waren die Werte bei den Gruppen, die den Impfstoff mit PD-Adjuvans bzw. den Impfstoff ohne Adjuvans bekamen. Wirkungslos im Vergleich zur Kontrollgruppe blieb der "Liposomen-Impfstoff".

Im Hinblick auf die Persistenz der K99-Antikörper in der Milch, d.h., in bezug auf die Ausscheidungsdauer, war der "Behring-Impfstoff" den anderen Impfstoffen deutlich überlegen. Kühe, die mit diesem Impfstoff vacciniert worden waren, wiesen noch am 5. Laktationstag eine hohe K99-Antikörperaktivität in der Milch auf, während z.B. bei den Kontrolltieren bereits am dritten Laktationstag keine K99-Antikörper in der Milch nachweisbar waren. Eine Verlängerung der K99-Antikörperausscheidung über die Milch bis zum 3. Laktationstag konnte durch die Vaccination mit den Impfstoffen "Saponin", "Liposomen", und PD-Adjuvans erreicht werden, wobei beim Saponinimpfstoff in den untersuchten Milchproben des 3. Laktationstages die mit Abstand höchsten K99-Antikörperaktivitäten gemessen wurden. Keine Verlängerung der K99-Antikörpersekretion, sondern nur eine Erhöhung der Kolostrumwerte stellten wir bei der Tiergruppe fest, die mit dem reinen Impfstoff ohne Adjuvans vacciniert worden war. Ab dem 6. Laktationstag lagen die mittleren Extinktionswerte der Milchproben von allen sechs Gruppen im negativen Bereich.

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse sind in Tabelle 4 die errechneten mittleren Antikörpertiter der verschiedenen Gruppen vergleichend zusammengestellt und in Abbildung 4 die verschiedenen K99-Antikörpertiterverläufe als Kurven einander gegenübergestellt.

Der mittlere Antikörpertiter der Kontrollgruppe betrug im Kolostrum (1. Laktationstag) 1:21. Danach fiel der Titer sofort stark ab und zwar auf 1:6 am 2. und auf 1:2 am 3. Laktationstag. In den später entnommenen Milchproben der Kontrollgruppe waren keine Antikörper gegen K99 festzustellen.

Ein nur unwesentlich besseres Ergebnis brachten die Antikörperuntersuchungen bei Tieren, die entweder mit dem Impfstoff ohne Adjuvans oder mit dem PD-Adjuvans- oder "Liposomen"-Impfstoff immunisiert worden waren. Im Kolostrum lag der K99-Antikörpertiter bei 1:128 (PD-Adjuvans-Vaccine), 1:52 ("Liposomen"-Vaccine) bzw. 1:45 ("reine" Vaccine). Während bei der "reinen" Vaccine noch am 2. Laktationstag ein Titer von 1:23 nachgewiesen werden konnte, fiel bei der PD-Adjuvans-Vaccine der Titer schon auf 1:10 und bei der "Liposomen"-Vaccine der Titer bereits auf 1:7 ab.

Die höchsten und am längsten persistierenden K99-Antikörpertiter in der Milch stellten wir in den Tiergruppen fest, die einen Impfstoff mit Saponin bzw. Saponin und Aluminiumhydroxid (Behring-Impfstoff) erhielten. Bei beiden Wirksamkeitskriterien schnitt der Behring-Impfstoff am besten ab. Die mit dieser Vaccine geimpften Tiere wiesen einen mittleren K99-Antikörpertiter von 1:324 im Kolostrum und am 2. Laktationstag einen Titer von 1:257 in der Milch auf. Diese hohen K99-Antikörpertiter fielen dann kontinuierlich von 1:32 (3. Laktationstag) über 1:14 (4. Laktationstag) auf 1:9 (5. Laktationstag). Am 6. und 7. Laktationstag waren in der Milch nur relativ geringe Mengen (1:5 bzw. 1:1,9) von K99-Antikörpern festzustellen. An diesem Zeitpunkt waren die Proben der anderen Tiere aber schon lange negativ.

Die Abbildung 4 veranschaulicht nochmals die Immunisierungsergebnisse. Die Kurven der mittleren K99-Antikörpertiter bei den geimpften Tieren liegen auf einem höheren Niveau und fallen im allgemeinen während der ersten Laktationswoche langsamer ab als die der Kontrollgruppe. Den deutlichsten Abstand zur Kurve der Kontrolltiere hat die Kurve der Tiergruppe, die zweimal mit dem Kombinationsimpfstoff der Fa. Behring geimpft worden ist.

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Wirksamkeitsbeurteilung der verschiedenen Impfstoffe war die Frage nach dem Prozentsatz der positiven Einzelproben. In Tabelle 5 und in Abbildung 5 wurde der Prozentsatz der positiven Proben aus der Tiergruppe, die mit dem Behring-Impfstoff vacciniert wurde, dem der nicht geimpften Kontrollgruppe gegenübergestellt. Als positiv wurden dabei Milchproben gewertet, die einen K99-Antikörpertiter größer als 1:2 hatten. In der geimpften Gruppe waren die Milchproben aller Kühe (100%) bis einschließlich Tag 5 der Laktationsperiode positiv. Am 6. Laktationstag wiesen noch 80 % und am 7. Tag noch 63,6 % der Milchproben K99-Antikörper auf. Am 14. Laktationstag war keine Milchprobe positiv.

In der Kontrollgruppe betrug der Prozentsatz positiver Proben am 1. Laktationstag 83,3 %, am 2. Tag 73,3 %, am 3. Tag 35,7 % und am 4. Laktationstag schließlich noch 3,2 % (1 von 31 Tieren). Ab dem 5. Laktationstag ließen sich in keiner einzigen Milchprobe der Kontrolltiere K99-Antikörper nachweisen.

2.2. Nachweis von E.coli K99-Keimen in den Kotproben von Kälbern mit Durchfall, die von vaccinierten Kühen stammten

1982 und 1983 wurden in einem kontrollierten Feldversuch 2000 trächtige Kühe mit dem Behring-Impfstoff (inaktiviertes Rota- und Parvovirus, E.coli K99-Antigen) immunisiert. Bei 17 Kälbern von geimpften Kühen trat innerhalb der ersten zwei Lebenswochen schwerer, wässriger Durchfall auf. Die Durchfallproben dieser Kälber wurden mit dem ELISA auf E.coli K99-Keime untersucht. In keiner einzigen Probe konnten E.coli K99-Keime nachgewiesen werden. Kontrollproben von Kälbern, die experimentell mit E.coli O 101:K99 infiziert worden waren und erkrankten, waren dagegen positiv.

2.3. Nachweis von E.coli K99-Antikörpern in Sera von geimpften Kühen und ihren Kälbern

Von 11 Kühen, die mit dem Behring-Impfstoff geimpft worden waren und ihren Kälbern wurden Serumproben auf K99-Antikörper untersucht. Die Proben stammten vom 1., 7. und 14. Tag post partum. In allen untersuchten Sera wurden K99-Antikörper festgestellt. Während bei den Kälbern zwischen den einzelnen Untersuchungstagen kaum ein Unterschied im K99-Antikörpergehalt zu beobachten war, zeigten alle Kühe am ersten Laktationstag im Serum einen deutlich höheren K99-Antikörperspiegel als am 7. und am 14. Laktationstag (vgl. Tabelle 6 und Abbildung 6).

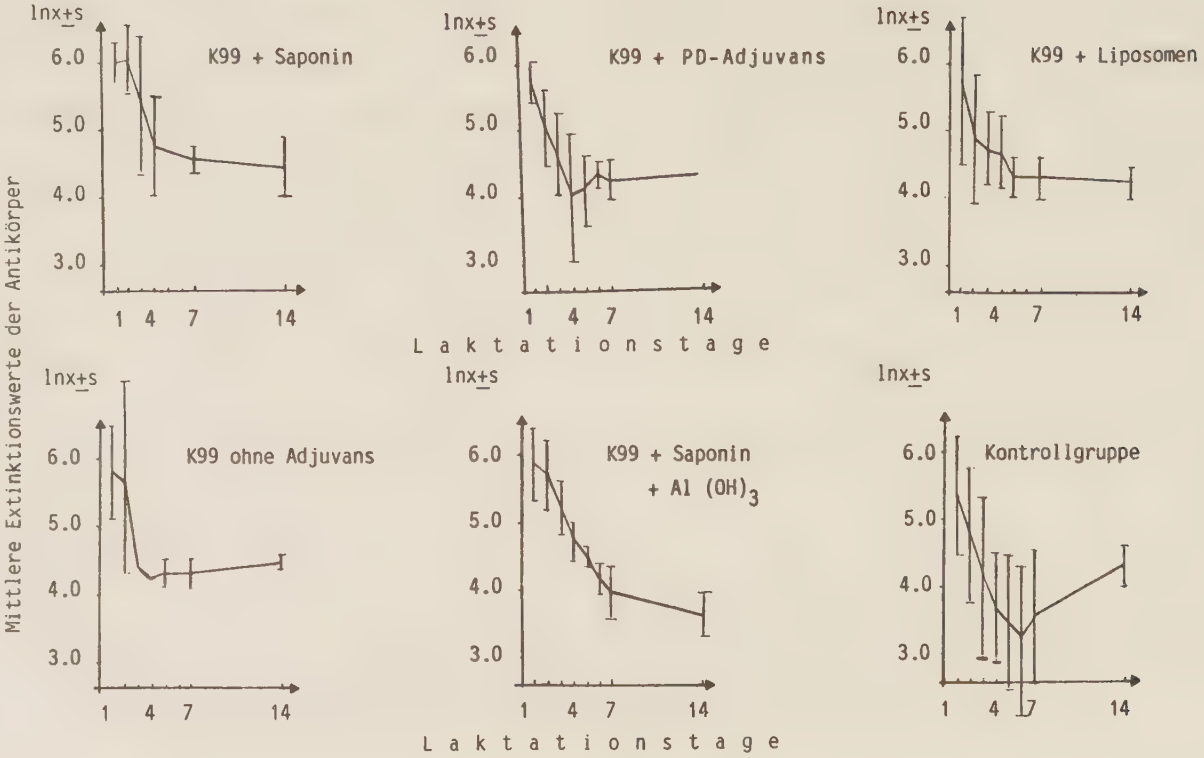
Im Vergleich zu dem K99-Antikörpergehalt in der Milch lagen die Serumwerte am 1. Tag post partum wesentlich niedriger, während am 7. und am 14. Tag post partum der K99-Antikörpergehalt in den Sera deutlich höher war als der K99-Antikörpergehalt in den Milchproben.

Tab.3: E.coli K99-Antikörperaktivität (mittlerer Extinktionswert im ELISA bei 450 nm) in Milchproben von Kühen, die zweimal im letzten Trächtigkeitsdrittel mit verschiedenen Vaccinen gegen E.coli K99 immunisiert wurden

Impfstoff	Adjuvans	K99-Milchantikörperaktivität an verschiedenen Laktationstagen post partum (ELISA)							
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	14.
K99-Antigen und inaktiviertes Rotavirus	Saponin (Quil A)	403.4[1] (13)[2] 0.33[3]	423.6 (4) 0.52	219.2 (3) 1.04	97.5 (3) 0.73	n.u.[4]	n.u.	94,6 (6) 0,20	84,7 (13) 0.45
	Liposomen	282.0 (10) 1.09	129.0 (5) 0.97	112.1 (5) 0.53	105.9 (5) 0.55	73.6 (5) 0.29	n.u.	73.6 (3) 0.34	69.0 (4) 0.22
	PD-Adjuvans	322.5 (6) 0.35	159.1 (6) 0.56	107.7 (5) 0.59	55.1 (6) 0.88	62.1 (6) 0.57	78.2 (4) 0.11	70.1 (5) 0.29	78.0 (1) 0.0
	ohne	330.2 (8) 0.69	284.2 (2) 1.36	77.4 (1) 0.0	67.9 (1) 0.0	72.2 (3) 0.20	n.u.	72,2 (5) 0.22	84.6 (4) 0.09
Behring - Impfstoff	Saponin + Al $(OH)_3$	350.7 (21) 0.57	320.5 (5) 0.54	181.2 (5) 0.43	110.0 (5) 0.28	91 (5) 0.13	64.7 (5) 0.25	54.1 (24) 0.39	38.9 (21) 0.30
Placebo - Gruppe		210.6 (36) 0.88	115.6 (30) 0.98	66.0 (28) 1.15	38.9 (31) 0.82	31.5 (25) 1.02	25.0 (22) 1.11	35.5 (25) 1.02	75.2 (6) 0.30

[1] geometr. Mittel der Extinktionswerte (Extinktionswerte x 10^3) [2] Anzahl der Proben [3] Standardabweichung [4] n.u. = nicht untersucht

Abb. 3: Graphische Darstellung der K99-Antikörperaktivitäten (logarithmierte mittlere Extinktionswerte im ELISA) in den Milchproben der mit verschiedenen Impfstoffen vaccinierten Gruppen und der Kontrollgruppe (vgl. Tab. 3)

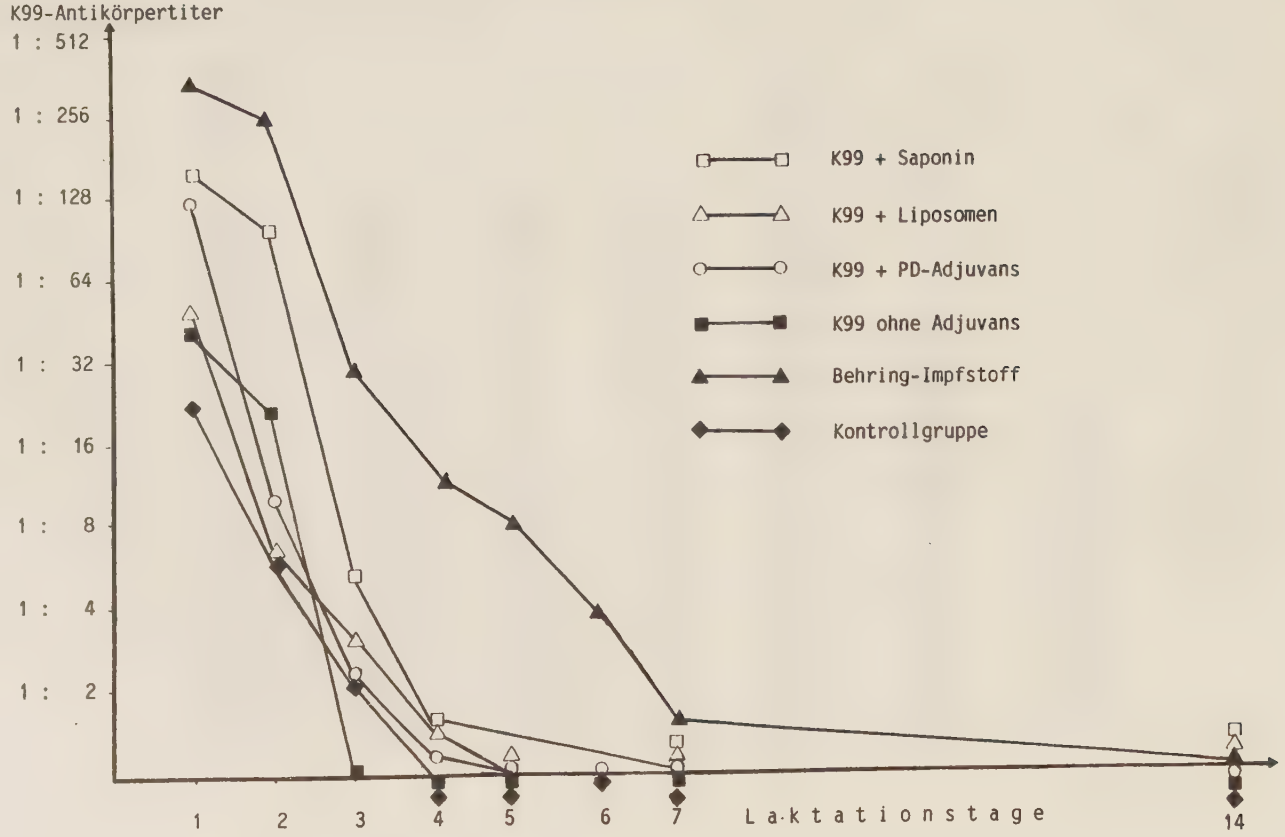


Tab. 4: E.coli K99-Antikörpertiter (geometrisches Mittel) in Milchproben von Kühen, die zweimal im letzten Trächtigkeitsdrittel mit verschiedenen Impfstoffen immunisiert wurden

Impfstoff	Adjuvans	K99-Milchantikörpertiter an versch. Laktationstagen post partum(ELISA)							
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	14.
K99 - Antigen und inaktiviertes Rotavirus	Saponin	1:150	1:91	1:5	1:1.6	n.u.[1)]	n.u.	neg.	neg.
	Liposomen	1:52	1:7	1:3.5	1:1.5	neg.	n.u.	neg.	neg.
	PD-Adjuvans	1:128	1:10	1:2.6	1:1.2	neg.	neg.	neg.	neg.
	ohne	1:45	1:23	neg.	neg.	neg.	n.u.	neg.	neg.
Behring - Impfstoff	Saponin und Al $(OH)_3$	1:324	1:257	1:32	1:14	1:9	1:5	1:1.9	neg.
Kontroll- bzw. Placebogruppe		1:21	1:6	1:2.1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

[1)] n.u. = nicht untersucht

Abb. 4: Die geometrischen Mittelwerte der K99-Antikörpertiter der verschiedenen Impfgruppen und der Kontrollgruppe und ihr Verlauf post partum

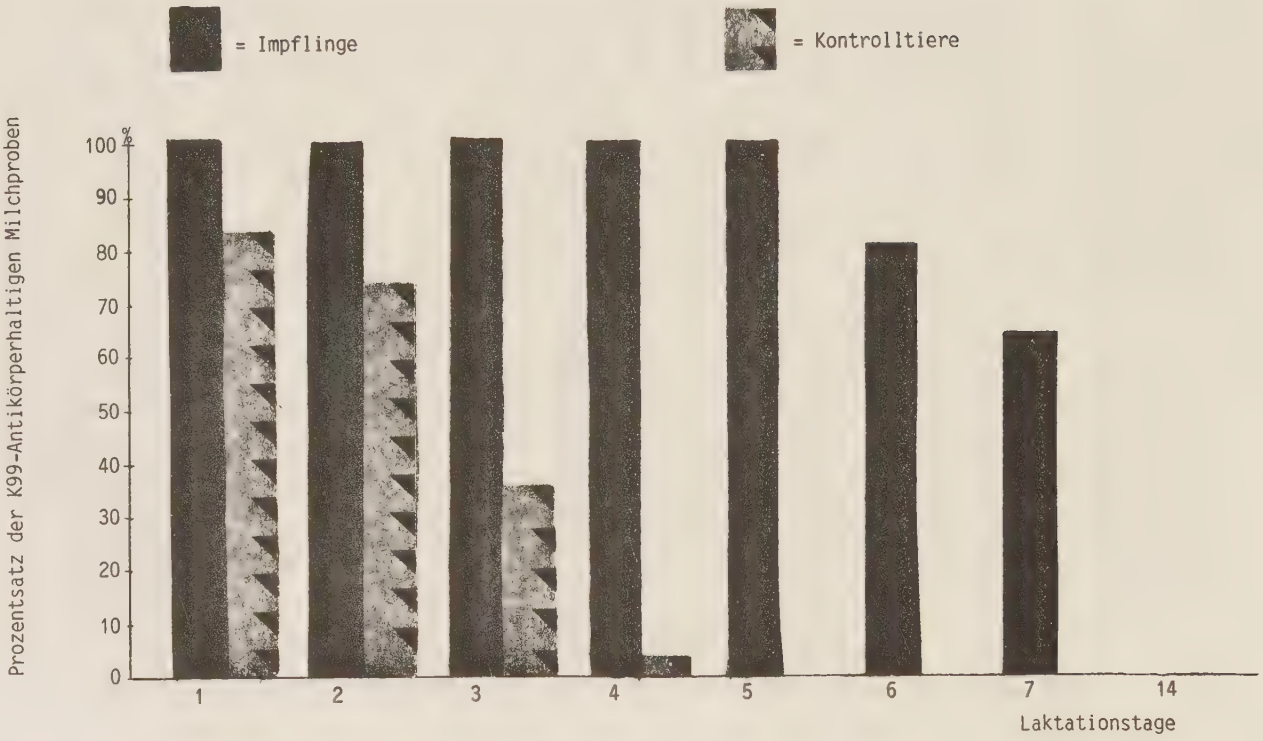


Tab. 5: Prozentsatz der K99-Antikörperhaltigen Milchproben an verschiedenen Laktationstagen von vaccinierten und nicht vaccinierten Kühen

Laktationstag post partum	Prozentsatz der K99-Antikörperhaltigen Milchproben	
	Impflinge[1)]	Kontrolltiere
1.	100 %	83,3 %
2.	100 %	73,3 %
3.	100 %	35,7 %
4.	100 %	3,2 %
5.	100 %	0,0 %
6.	80 %	0,0 %
7.	63,6 %	0,0 %
14.	0,0 %	0,0 %

1) Behring-Impfstoff

Abb. 5 Prozentsatz der K99-Antikörperhaltigen Milchproben an verschiedenen Laktationstagen von vaccinierten und nicht vaccinierten Kühen



Tab. 6: E.coli K99-Antikörperaktivität (mittlerer Extinktionswert im ELISA) in Milch und in Sera von geimpften Kühen (Behring-Impfstoff) und ihren Kälbern

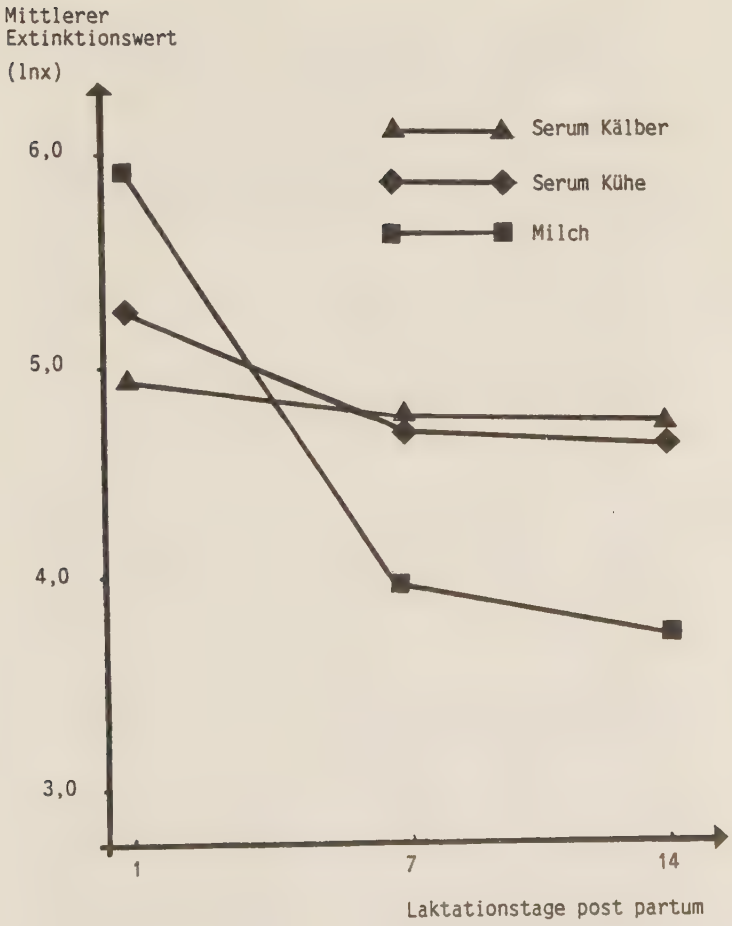
Untersuchungsmaterial		K99-Antikörperaktivität an verschiedenen Laktationstagen post partum		
		1.	7.	14.
Kälber von vaccinierten Kühen	Serum	124,8 [1] (3) [2] 0,135 [3]	117,0 (9) 0,105	115,4 (6) 0,074
vaccinierte Kühe	Serum	190,9 (10) 0,185	110,1 (3) 0,149	108,7 (4) 0,133
	Milch	350,7 (21) 0,57	54,1 (24) 0,39	38,9 (21) 0,30

[1] geometrisches Mittel der Extinktionswerte (Extinktionswerte x 10^3)

[2] Anzahl der Proben

[3] Standardabweichung

Abb. 6 : Graphische Darstellung (mittlerer Extinktionswert im ELISA) der K99-Antikörperaktivitäten in Milch und Serumproben von vaccinierten Kühen und ihren Kälbern an verschiedenen Laktationstagen



D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Untersuchungen beweisen, daß es möglich ist, durch eine gezielte Immunprophylaxe bei Kühen die Ausscheidung von K99-Antikörpern über die Milch zu erhöhen und zu verlängern. Durch die Übertragung von K99-Antikörpern über die Milch auf das Neugeborene kann die Haftung und Vermehrung von enterotoxischen E.coli-Keimen verhindert werden, denn die laktogene Immunität ist ein entscheidender Faktor für die Abwehr von Darminfektionen bei neugeborenen Kälbern (Rutter und Jones 1973, Rutter et al., 1976). Wie bereits in früheren Feldversuchen nachgewiesen wurde, resultiert daraus eine geringere Durchfallinzidienz bei Kälbern, Ferkeln und Lämmern (Acres et al., 1979, Acres et al., 1982, Snodgrass et al., 1982, Eichhorn et al., 1982, Morgan et al., 1978, Sojka et al., 1978, Morris et al., 1980).

Viele Faktoren beeinflußen die Stimulierung von Milchantikörpern. Da bei der Kuh aus physiologischen Gründen die vielversprechende enterale Immunisierung ausscheidet, war es zunächst für die Wirksamkeitsbeurteilung einer Immunprophylaxe wichtig zu wissen, inwieweit die in unserem Unternehmungsbereich stehenden Kühe bereits einen natürlichen Kontakt mit dem K99-Antigen hatten. Das positive Ergebnis bei über 80 % aller Kolostralmilchproben von nicht vaccinierten Kontrollkühen zeigte, daß die vorgenommene zweimalige subkutane Impfung einer Reimmunisierung bereits sensibilisierter Kühe gleichkam. Wie die Erfahrungen aus der Praxis und aus früheren Untersuchungen bewiesen, reicht der natürliche Gehalt von K99-Antikörpern in den meisten Fällen nicht aus, um neugeborene Tiere vor

E.coli-Infektionen zu schützen (Newmann et al., 1973, Morgan et al., 1978, Acres et al., 1979, Nagy, 1980). Unsere Antikörperuntersuchungen bestätigten auch das physiologisch bedingte schnelle Absinken der Milchimmunoglobuline bei der Kuh (Porter, 1972).

Am 3. Laktationstag war nur noch bei 1 (3,2 %) von 31 untersuchten Proben von Kontrolltieren ein K99-Antikörpertiter in der Milch nachweisbar. In dieser Tatsache ist sicherlich eine bedeutende Ursache für die großen wirtschaftlichen Probleme zu sehen, die E.coli K99-Infektionen weltweit für die Rinderaufzuchtbetriebe darstellen.

Die Qualität der postvaccinalen K99-Antikörpersekretion über die Milch war im wesentlichen vom Impfstoff abhängig. Im Gegensatz zu den meisten bisherigen Impfversuchen, in denen mit formalininaktivierten E.coli K99-Keimen geimpft wurde, verwendeten wir für die Muttertierimpfung ein grob gereinigtes K99-Antigen. Vergleichende Untersuchungen von Acres et al. (1979) bestätigten, daß Impfstoffe auf der Basis von gereinigtem K99-Antigen etwas wirksamer sind als jene aus inaktivierten Ganzbakterien.

Neben dem Antigen spielte das Adjuvans für die Wirksamkeit eine große Rolle. Die höchsten K99-Antikörpertiter und die längste Ausscheidung erreichten wir durch den Zusatz von Saponin bzw. einer Kombination aus Saponin und Aluminiumhydroxid. Dies stimmte mit den Untersuchungen von Eichhorn (1981) überein, der die Rotavirusantikörpersekretion über die Milch vaccinierter Kühe untersuchte. Während in seinen Ergebnissen keine wesentlichen Unterschiede zwischen Impfstoffen mit den

Adjuvantien Saponin, PD-Adjuvans oder Aluminiumhydroxid festzustellen war, lagen bei uns in Hinsicht auf die K99-Antikörperausscheidung die Impfstoffe mit dem Saponin bzw. Saponin/Aluminiumhydroxid deutlich über den Impfstoffen mit PD-Adjuvans oder Liposomen.

Die meisten vergleichbaren Untersuchungen basierten auf dem Nachweis der K99-Antikörperausscheidung im Kolostrum. Unsere Ergebnisse bestätigten die bisherigen Erfahrungen, daß durch eine zweimalige Vaccination im letzten Trächtigkeitsdrittel der K99-Antikörpertiter im Kolostrum gesteigert werden kann. Nur Snodgrass et al. (1982) untersuchten ebenfalls die K99-Antikörperausscheidung in der Milch über einen längeren Zeitraum. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Snodgrass et al., die noch am 14. Laktationstag K99-Antikörper in der Milch nachweisen konnten, waren bei den von uns vaccinierten Kühen selbst im günstigsten Fall nach 6 Laktationstagen nur noch bei einem Teil der Kühe K99-Antikörper in der Milch festzustellen. Zwei Unterschiede im Versuchsansatz können hierfür verantwortlich gemacht werden. Einmal läßt sich nicht ausschließen, daß Snodgrass et al. in ihrem Versuch Tiere verwendeten, die bereits das Jahr zuvor zu einem ähnlichen Versuch herangezogen worden waren. So kämen die Immunisierungen von Snodgrass et al., Auffrischimpfungen gleich, die höhere Antikörpertiter erreichen, wie Desmettre et al. (1982) und Haddard et al. (1980) aufzeigten. Der zweite Punkt, der hier eventuell eine Rolle spielen könnte, ist die Milchleistung der Tiere. Nach Eichhorn (1981) ist es vorstellbar, daß bei Kühen mit niedrigen Milchleistungen höhere Antikörpertiter gefunden werden als bei Kühen mit hoher Milchleistung. Eine endgültige Aussage über den Einfluß obiger Faktoren auf die Wirksamkeit

einer Muttertierimpfung kann derzeit noch nicht gemacht werden, da entsprechende vergleichende Untersuchungen bisher noch nicht durchgeführt wurden.

Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Verlängerung der K99-Antikörperausscheidung bis zum 6. Laktationstag in Verbindung mit der Erhöhung der K99-Antikörpersekretion reicht aber sicherlich für einen Schutz neugeborener Kälber gegenüber der E.coli K99-Infektion aus, da ETEC-Stämme sich nur an den ersten Lebenstagen an das Darmepithel anheften können (Rycke und Roux, 1982, Smith und Halls, 1967, Runnels et al., 1980, Snodgrass et al., 1982). Die bisherigen Ergebnisse der parallel im Feldversuch mit dem Behring-Impfstoff durchgeführten statistischen Erhebungen bestätigen die gute Wirksamkeit der Muttertiervaccination (Eichhorn et al., 1982).

In keiner einzigen Faezesprobe von durchfallkranken Kälbern, die von geimpften Kühen stammten, konnten wir E.coli K99-Keime feststellen. Auch Snodgrass et al., 1982, berichteten, daß Kälber von geimpften Kühen deutlich weniger ETEC-Keime über den Kot ausschieden als Kälber von nicht vaccinierten Kühen.

Geimpfte Kühe und deren Kälber wiesen auch deutliche K99-Antikörpertiter im Serum auf. Interessanterweise fiel der Serumtiter bei den Kühen an den ersten Laktationstagen ab. Dies könnte darauf hinweisen, daß zumindest ein Teil der Milchantikörper aus dem Serum stammt und nicht lokal in der Milchdrüse produziert wird. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden, daß IgG_1 den Hauptanteil der K99-Antikörper in Serum und im Kolostrum ausmacht (Eichhorn, 1981, Morris et al., 1980, Newby und Bourne, 1977).

Die gute Wirksamkeit der von uns getesteten, kombinierten Muttertiervaccine in der Praxis (Eichhorn et al., 1982) basiert sicher auch auf der im Impfstoff enthaltenen Rotaviruskomponente. Rotaviren sind neben enterotoxischen E.coli-Keimen die wichtigsten Durchfallerreger beim Kalb (Baljer und Bachmann, 1980, Snodgrass et al., 1982). Die Verbesserung der Rotavirusantikörperausscheidung über die Milch durch die Muttertiervaccination, wie sie bereits von Eichhorn (1981) nachgewiesen wurde, schützt dabei nicht nur gegen die Rotavirusinfektion, sondern auch indirekt gegen die E.coli-Infektion, da eine vorausgehende Rotavirusinfektion die Entstehung der E.coli-Infektion begünstigt (Snodgrass et al., 1982).

Mit der Impfung trächtiger Muttertiere mit dem K99-Antigen steht eine neue und zuverlässige Prophylaxemaßnahme für die Bekämpfung neonataler Kälberdurchfälle zur Verfügung. Sie hat gegenüber der bisher praktizierten Methode der aktiven oralen Immunisierung des Kalbes den Vorteil, daß 1. mit dem K99-Antigen eine serotypübergreifende Wirksamkeit erzielt wird, 2. an Stelle einer zehnmaligen oralen Applikation beim Kalb eine zweimalige subkutane Impfung des Muttertieres tritt und 3. das K99-Antigen mit anderen Antigenen wie z.B. Virusantigenen kombiniert werden kann. Die aktive orale Immunisierung hat andererseits den Vorteil, daß 1. ihre Wirksamkeit unabhängig von der Muttermilchaufnahme ist, 2. nicht schon vor der Geburt die Impftermine beim Muttertier eingeplant werden müssen und 3., bedingt durch die einfache Herstellungsweise, mit der Schluckvaccine auch stallspezifisch geimpft werden kann. Der letzte Punkt ist vor allem wichtig im Hinblick auf das gelegentliche Auftreten von K99-negativen enterotoxischen E.coli-Stämmen beim Kalb (Braaten und Myers, 1977, Contrepois et al. (1982)

Da beide Methoden Vor- und Nachteile haben, müssen letztendlich epidemiologische und haltungstechnische Gesichtspunkte den Ausschlag für die eine oder andere Methode geben. So ist die Muttertierimpfung in Betrieben mit Mutterkuhhaltung sicher die Methode der Wahl, da die zehnmalige orale Impfung an den ersten zehn Lebenstagen des Kalbes arbeitstechnisch sehr aufwendig ist. In Betrieben mit Eimertränke oder in Betrieben, in denen K99-negative enterotoxische E.coli-Keime heimisch sind, bietet sich der Einsatz der aktiven oralen Immunisierung an.

E ZUSAMMENFASSUNG

112 Kühe und Färsen wurden in 5 Impfgruppen und 1 Kontrollgruppe eingeteilt und mit verschiedenen E.coli K99-Vaccinen je zweimal gegen Ende der Trächtigkeit parenteral immunisiert, um die Ausscheidung von K99-Antikörpern in der Milch frischlaktierender Rinder zu erhöhen und zu verlängern. Zum Nachweis der Milchantikörper diente der ELISA.

Der mittlere K99-Antikörpertiter im Kolostrum der nicht geimpften Tiere betrug 1:21. Circa 83 % der Kontrolltiere besaßen K99-Antikörper im Kolostrum. Am 2. bis 3. Laktationstag konnten bei 70 % bis 30 % der Kontrolltiere nur geringe K99-Milchantikörpertiter nachgewiesen werden. Die in dieser Gruppe ab dem 4. Laktationstag entnommenen Milchproben waren alle negativ.

Mit der zweimaligen Muttertierimpfung ließ sich die K99-Antikörperausscheidung über die Milch deutlich verbessern. Die Wirksamkeit war abhängig vom Impfstoffadjuvans. Die höchsten K99-Antikörpertiter und die längste K99-Antikörperausscheidung stimulierte die K99-Vaccine mit Saponin und Aluminiumhydroxid. Der Kolostrumtiter dieser Impfgruppe lag um mehr als das zwölffache über dem der Kontrollgruppe und um ca. das achtfache über dem der mit K99-Antigen ohne Adjuvans geimpften Gruppe. Bis zum 5. Tag post partum schieden alle Tiere,am 6. Tag 80 % und am 7. Laktationstag noch 64 % der Kühe dieser Gruppe K99-Antikörper über die Milch aus.

In Faecesproben von an Durchfall erkrankten Kälbern, die von Kühen stammten, die mit der Muttertiervaccine geimpft worden waren, konnten keine enterotoxischen E.coli-Keime nachgewiesen werden.

Alle untersuchten Sera von geimpften Kühen und ihren Kälbern hatten einen nachweisbaren K99-Antikörpergehalt. Der Serumtiter lag in den ersten Tagen post partum unter dem Titer der Milch.

SUMMARY

Experimental investigations about the secretion of E.coli K99 antibodies via the milk of vaccinated and non vaccinated cows

112 cows and heifers in 5 groups and 1 control group were parenterally vaccinated twice with different K99 vaccines at the end of gestation in order to increase and prolong K99 antibody secretion in the milk during the first days of lactation. The ELISA was used to detect K99 antibodies in milk.

The average titre of colostrum K99 antibodies in the non-vaccinated cows was 1:21. About 83 % of all control cows had K99 antibodies in colostrum. From the 2nd to the 3rd day of lactation only a small quantity of K99 antibodies could be detected in the milk of 70 % to 30 % of control cows. The milk taken from the cows of this group on the 4th day of lactation had no K99 antibodies.

K99 antibody secretion in milk could be significantly improved by twofold vaccination of dams. The effect of vaccination depended on the adjuvant. Highest K99 antibody titres and the longest secretion of K99 antibodies were observed using a vaccine with saponin and Al $(OH)_3$ as adjuvant. The titre of colostrum from this group was more than twelve times higher than the titre of the control group and was about eight times higher than the titre of the group given K99 antigen without any adjuvant. On the 5th day of lactation all cows, on the 6th day 80 % and on the 7th day 64 % of cows tested still had K99 antibodies in milk.

Enterotoxigenic E.coli could not be detected in faeces of calves with diarrhea born to cows given K99 vaccine.

Specific antibody titres were found in all sera of vaccinated cows and their calves. During first days of lactation titres of sera were lower than titres of milk.

F LITERATURVERZEICHNIS

1. Acres, S.D., R.E. Isaacson, L.A. Babuik u. R.A. Kapitany, 1979:
Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins.
Infect. Immun. 25, 121-126

2. Acres, S.D., Forman, A.J., Kapitany, R.A., 1982:
Antigen-extinction profile in pregnant cows, using a K99-containing whole-cell bacterin to induce passive protection against enterotoxigenic colibacillosis of calves.
Am. J. Vet. Res. 43 (4), 569-575

3. Baljer, 1977:
Erfahrungen mit der oralen Schutzimpfung von Kälbern gegen Escherichia coli.
Tierärztliche Umschau 32, 527-538

4. Baljer und Bachmann, 1980:
Nachweis enteropathogener Escherichia coli-Stämme und Rotaviren in Kotproben von Kälbern mit Diarrhoe.
Zbl. Vet. Med. B 27, 608-615

5. Blumenstock, E., Jann, K., 1982:
Adhesion of piliated Escherichia coli strains to phagocytes:
differences between bacteria with mannose-sensitiv pili and those with mannose-resistant pili.
Infect. Immun. 35, 264-269

6. Braaten, B.A. und L.L. Myers, 1977:
Biochemical characteristics of enterotoxigenic and nonenterotoxigenic Escherichia coli isolated from calves with diarrhea.
Am. J. Vet. Res. 38, 1989 - 1991

7. Brinton, C.C., 1959:
Non-flagellar appendages of bacteria.
Nature (London) 183, 782-786

8. Brinton, C.C., Jr., 1965:
The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria.
Trans. N.Y. Acad. Sci. 27, 1003-1054

9. Burrows, M.R., R. Sellwood, R.A. Gibbons, 1976:
Hemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of Escherichia coli.
J. Gen. Microbiol. 96, 269-275

10. Chan, R., Acres and Costerton, 1982:
Use of specific antibody to demonstrate Glycocalix, K99 pili and the spatial relationships of K99+ETEC in the ileum of colostrum-fed calves.
Infect. Immun. Sept. 1982, 1170-1180

11. Chanter, N. 1982:
Structural and functional differences of the anionic and cationic antigens in K99 extracts of E.coli B 41.
J. Gen. Microbiol. 128 (7), 1585-1589

12. Contrepois M., J. P. Giradeau, Ph. Gouet, Ph. Desmettre, 1982:
Vaccination contre l'Antigene K99 et d'autres "adhesines" des Escherichia coli bovins.
Proc. of the XIIth World Congr. on Dis. of Cattle, Amsterdam

13. Contrepois, M., J. P. Giradeau, H.C. Dubourguier, and P. Gouet, 1982:
Mise en évidence de quelques facteurs intervenant dans la biosynthèse de l'ag K99.
In P. Pohl and J. Leunen (ed.), Resistance and pathogenic plasmids. C.E.C. Seminar 1981 Brussels, National Institute for Veterinary Research, 206-227

14. Dalsgaard, K., 1978:
A study of the isolation and characterization of the saponin Quil A.
Acta.vet.scand. 19, Suppl. 69, 1-40

15. de Graaf, F.K., P. Klaasen-Boor, and J.E. van Hees, 1980:
Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine.
Infect. Immun. 30, 125-128

16. de Graaf, F. K., P. Klemm, and W. Gaastra, 1981:
Purification, characterization and partial covalent structure of the adhesive antigen K99 of Escherichia coli.
Infect. Immun. 33, 877-883

17. de Graaf, F.K., and F.R. Mooi, 1982:
The K88 and K99 plasmids of enterotoxigenic E.coli strains.
In P. Pohl and J. Leunen (ed.) Resistance and pathogenic plasmids. C.E.C. Seminar 1981 Brussels, National Institute of Veterinary Research, 191-203

18. de Graaf, F.K., and I. Roorda, 1982:
Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calves enteropathogenic E.coli strain B41.
Infect. Immun. 36, 751-753

19. de Graaf, F.K., F.B. Wientjes, and P. Klaasen-Boor, 1980:
Production of K99 antigen by enterotoxigenic Escherichia coli strains of antigen groups 08, 09, 020, and 0101 grown at different conditions.
Infect. Immun. 27, 216-221

20. Desmettre, Ph., G. Tixier, J. Espinasse, L. Valette, 1982:
Protection de l'enterite colibacillaire néonatale du veau par vaccination de la vache gestante.
Proc. of the XIIth World Congr. on Dis. of Cattle, Amsterdam

21. Duguid, J.P., and D.C. Old, 1980:
Adhesive properties of Enterobacteriaceae.
In E.H. Beachey (ed.), Bacterial adherence, receptors and recognition, series B, vol. 6, 185-217, Chapman and Hall, London

22. Duguid, J.P., W. Smith, G. Dempster, and P. N. Edmunds, 1955:
Nonflaggellar filamentous appendages ("fimbriae") and hemagglutinating activity in Bacterium coli.
J. Pathol. Bacteriol. 70, 335-348

23. Edelmann, R. 1980:
Vaccine adjuvants.
Inf. Dis. Rev. 2, 370-383

24. Eichhorn, 1981:
Verlängerung der Ausscheidung von Rotavirusantikörpern mit der Milch frischlaktierender Kühe durch parenterale Vaccination.
Vet. Med. Diss., München

25. Eichhorn, W., Bachmann, P., Baljer, G., Plank, P., Schneider, P. 1982:
Vaccinierung hochträchtiger Rinder mit einem kombinierten Rotavirus/E.coli-Impfstoff zur Prophylaxe von Durchfallserkrankungen bei neugeborenen Kälbern.
Tierärztliche Umschau 37, 599-600, 602-604

26. Ellens, D.J., P.W. de Leeuw, H. Rozemond, 1978:
The K99 antigen of E.coli:
Application of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for detection of the antigen in calf faeces and for titration of spezific antibody.
Central Vet. Inst., Virol. Department, 8221, RA LELYSTAD, The Netherlands

27. Engvall, E., P. Perlmann, 1972:
Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III.
Journal of Immunology 109, 129-135

28. Evans, D.G., D. J. Evans, Jr., 1978:
New surface associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic E.coli of serogroups 06 and 08.
Infect. Immun. 21, 638-647

29. Evans, D.J., Jr., D.G. Evans, and H.L. DuPont, 1979:
Hemagglutination patterns of enterotoxigenic E.coli and enteropathogenic E.coli determined with human, bovine, chicken, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose.
Infect. Immun. 23, 336-346

30. Francis, D.H., Remmers, G.A., De Zeeuw, P., 1982:
Production of K88, K99 and 987P antigens by E.coli cultured on synthetic and complex media.
J. Clin. Microbiol. 15 (1), 181-183

31. Fusco, P., A. To, S. To and C. Brinton, Jr., 1978:
The purification and characterization of four types of E.coli pili and the specifity of E.coli pili for immunity, colonization and adhesion.
In C. Miller (ed.) XIII U.S.-Japan Conference on Cholera, Atlanta, Ga., Sept. 1977.
National Inst. of Health, Bethesda, Md. 60-70

32. Gaastra, W. and F. de Graaf, 1982:
Host-specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic E.coli strains.
Microbiol. Rev., Juni 1982, 129-161

33. Giradeau, J. P., Dubourguier, H.C., Gouet, P., 1982:
Inhibition of K99 antigen synthesis by L-alanin enterotoxigenic Escherichia coli.
J. Gen. Microbiol. 128 (3), 463-470

34. Giradeau, J.P., Dubourguier, H.C., Gouet, P., 1982:
Effect of glucose and amino acids on expression of K99 antigen in Escherichia coli.
J. Gen. Microbiol. 128, 2243-2249

35. Gregoriadis, G., D. Putman, L. Louis, D. Neerunjun, 1974:
Comparative effect and fate of non-entrapped and liposome-entrapped neuranimidase injected into rats.
Biochem. J. 140, 323-330

36. Guinée, P.A.M., W.H. Jansen, 1979:
Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in E.coli strains of human, porcine and bovine origin:
a comparative study.
Zentralbl. Bacteriol. Parasitenka. Infectionkr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A 243, 245-257

37. Guinée, P.A.M., W.H. Jansen, and C. M. Agterberg, 1976:
Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in E.coli isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity.
Infect. Immun. 13, 1369-1377

38. Guinée, P.A.M., J. Veltkamp, and W.H. Jansen, 1977:
Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of Escherichia coli.
Infect. Immun. 15, 676-678

39. Hadad, J.J., Gyles, C.L., 1982:
The role of K antigens of enteropathogenic E.coli in colonization of the small intestine of calves.
Can. J. Comp. Med. 46 (1), 21-26

40. Haggard, D.L., Springer, J.A., Vosdingh, R.A., 1982:
Efficacy of a single annual booster inoculation of cows with E.coli bacterin for preventing enteric colibacillosis in neonatal calves.
Vet. Med.a.Small An.Clin. 77 (10), 1525-1527

41. Haggard, D.L., Johnson, D.W., Springer, J.A., Vosdingh, R.A., 1982:
Evaluation of an E.coli bacterin containing the K99 antigen for preventing bovine neonatal enteric colibacillosis.
Vet.Med. Small An.Clin. 77 (9), 1391-1394

42. Heß, R.E., P.A. Bachmann, G. Baljer, A. Mayr, A. Pospischil, G.N. Schmid:
Synergism in experimental mixed infections of newborn colostrum-deprived calves with bovine rotavirus and enterotoxigenic E.coli.
Einger. zur Publ.

43. Houwink, A.L., and W. van Iterson, 1950:
Electron microscopial observations on bacterial cytology, a study on flagellation.
Biochem. Biophys. Acta 5, 10-44

44. Isaacson, R.E., 1977
K99 surface antigen of Escherichia coli: purification and partial characterization.
Infect. Immun. 15, 272-279

45. Isaacson, R.E., 1978:
K99 surface antigen of Escherichia coli: antigenic characterization.
Infect. Immun. 22, 555-559

46. Isaacson, R.E., 1980:
Factors affecting expression of the Escherichia coli pilus K99.
Infect. Immun. 28, 90-194

47. Isaacson, R.E., J. Colmenero, and P. Richter, 1981:
Escherichia coli pili K99 are composed of one subunit species.
FEMS Microbiol. Lett. 12, 229-232

48. Isaacson, R.E., E.A. Dean, R.L. Morgan, and H.W. Moon, 1980:
Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic Escherichia coli-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified K99 or 987P pili:
antibody production in response to vaccination.
Infect. Immun. 29, 824-826

49. Isaacson, R.E., H.W. Moon, and R.A. Schneider 1978:
Distribution and virulence of Escherichia coli in the small intestines of calves with and without diarrhea.
Am.J.Vet. Res. 39, 1750-1755

50. Jones, G.W., 1977:
The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells.
In J.L. Reissig (ed.), Microbi. interactions, receptors and recognition, series B, Vol 3, Chapman and Hall, London

51. Kehoe, M., R. Sellwood, P. Shipley, and G. Dougan, 1981:
Genetic analysis of K88-mediated adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli.
Nature (London) 291, 122-126

52. Korhonen, T.K., E.I. Nurmiaho, H. Ranta, and C. Svanberg-Eden, 1980:
New method for isolation of immunologically pure pili from E.coli.
Infect. Immun. 27, 569-575

53. Leresche, E., J.H. Penseyres, 1982:
Réponse anticorps a l'antigene d'attachement K99 d'Escherichia coli d'un vaccin polyvalent contre les colibacilloses d'une forme enterotoxemique et forme septicemique.
Proc. of the XIIth World Congr. on Dis. of Cattle, Amsterdam

54. Moon, H.W., Mc Donald, J.S., 1983:
Antibody response of cows to Escherichia coli pilus antigen K99 after oral vaccination with live or dead bacteria.
Am.J.Vet.Res. 44 (3), 493-496

55. Moon, H.W., B. Nagy, R.E. Isaacson, and I. Orskov, 1977:
Occurrence of K99 antigen on Escherichia coli isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99^{+} enterotoxigenic E.coli from calves and pigs.
Infect. Immun. 15, 614-620

56. Moon, H.W., S.C. Whipp, and S.M. Skarvedt, 1976:
Etiologic diagnosis of diarrheal diseases of calves:
frequency and methods for detecting enterotoxin and K99 antigen production by Escherichia coli.
Am.J.Vet.Res. 37, 1025-1029

57. Morgan, R.L., R.E. Isaacson, H.W. Moon, C.C. Brinton, and C.-C.To. 1978:
Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic Escherichia coli-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987 or K99 pili:
Protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge.
Infect. Immun. 22, 771-777

58. Morris, J.A., A.E. Stevens, and W.J. Sojka, 1977:
Preliminary characterization of cell-free K99 antigen isolated from Escherichia coli B 41.
J. Gen. Micrbiol. 99, 353-357

59. Morris, J.A., A.E. Stevens, and W.J. Sojka, 1978:
Anionic and cationic components of the K99 surface antigen from Escherichia coli B 41.
J. Gen. Microbiol. 107, 173-175

60. Morris, J.A., A.E. Stevens, and W.J.Sojka, 1978:
Isoelectric point of cell-free K99 antigen exhibiting hemagglutinating properties.
Infect. Immun. 19, 1097-1098

61. Morris, J.A., C. Thorns, A.C. Scott, and W.J. Sojka, 1982:
Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (F41) produced by a K99⁻mutant of the reference strain E.coli B 41.
Infect. Immun. 36, 1146-1153

62. Morris, J.A., C.J. Thorns, and W.J. Sojka, 1980:
Evidence for the two adhesive antigens on the K99 reference strain B 41.
J. Gen. Microbiol. 118, 107-113

63. Morris, J.A., C. Wray, and W.J. Sojka, 1980:
Passive protection of lambs against enteropathogenic Escherichia coli: role of antibodies in serum and colostrum of dams vaccinated with K99 antigen.
J. Med. Microbiol. 13, 265-271

64. Myers, L.L., and P.A.M. Guinée, 1976:
Occurence and characteristics of enterotoxogenic E.coli isolated from calves with diarrhea.
Infect. Immun. 13, 1117-1119

65. Nagy, B., 1980:
Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxic colibacillosis.
Infect. Immun. 27, 21-24

66. Nagy, B. and Nagy, G., 1982:
Detection of virulence factors of enteropathogenic E.coli in the diagnosis of calf diarrhea.
Magyar Allatorvosok Lapja 37, (8) 512-517

67. Newby, T.J., J. Bourne, 1977:
The nature of the local immune system of the bovine mammary gland.
J. Immunol. 118, 2521-2525

68. Newmann, F.S., Myers, L.L., Firchammer, B.D., Catlin, J.E., 1973:
Prevention of experimentally induced enteric colibacillosis in newborn calves.
Infect. Immun. 8, 540-543

69. Orskov, I.,F. Orskov, H.W. Smith, and W.J. Sojka, 1975:
The establishment of K99, a thermolabile, transmissible Escherichia coli K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 83, 31-36

70. Orskov, I., F. Orskov, W.J. Sojka, and J.M. Leach, 1961:
Simultaneous occurrence of E.coli B and L antigens in strains from diseased swine.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 53, 404-422

71. Ottow, J.C.G., 1975:
Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili.
Annu. Rev. Microbiol. 29, 79-109

72. Pearson, G.R., Logan, E.F., 1982:
Ultrastructural changes in the small intestine of neonatal calves with enteric colibacillosis.
Vet. Path. 19 (2), 190-201

73. Porter, P., 1972:
Immunoglobulins in bovine mammary secretions. Quantitative changes in early lactation and absorption by the neonatal calf.
Immunology 23, 225-238

74. Runnels, P.L., H.W. Moon, and R.A. Schneider 1980:
Development of resistance with host age to adhesion of $K99^{+}$ E.coli to isolated intestinal epithel cells.
Infect. Immun. 28, 298-300

75. Rutter, J.M., and G.W. Jones, 1973:
Protection against enteric disease caused by Escherichia coli- a model for vaccination with a virulence determinant?
Nature (London) 242, 531-533

76. Rutter, J.M., G.W. Jones, G.T.H. Brown, M.R. Burrows, and P.D. Luther, 1976:
Antibacterial activity in colostrum and milk associated with protection of piglets against enteric disease caused by K88-positive E.coli.
Infect. Immun. 13, 667-676

77. Rutter, P.R., and B. Vincent, 1980:
The adhesion of micro-organism to surfaces physico-chemical aspects.
In R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Meiling, P.R. Rutter, and B. Vincent (ed.), Microbial adhesion to surfaces.
Ellis Horwood Ltd. Chichester, England.

78. Rycke, J.de, Roux, P., 1981:
Frequency of enteropathogenic E.coli $K99^+$ ST^+ and rotavirus in diarrhea in newborn calves. A field study in Sarthe, France.
Ann. Rech. Vêt. 12 (4), 403-411

79. Salit, I.E., and E.C. Gotschlich, 1977:
Hemagglutination by purified type 1 E.coli pili.
J. Exp. Med. 146, 1169-1181

80. Smith, H.W., and S. Halls, 1967:
Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods in Escherichia coli infections in pigs, calves, lambs and rabbits.
J. Pathol. Bacteriol. 93, 499-529

81. Smith, H.W., and M.B. Huggins, 1978:
The influence of plasmid-determined and other characteristics of enteropathogenic E.coli on their ability to proliferate in the alimentary tracts of piglets, calves and lambs.
J. Med. Microbiol. 11, 471-492

82. Smith, H.W., and M.A. Linggood, 1972:
Further observations on E.coli enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains:
the transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains.
J. Med. Microbiol. 5, 243-250

83. Smyth, C.J., P. Jonsson, and T. Wadström 1978:
Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic Escherichia coli with or without K88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography.
Infect. Immun. 22. 462-472

84. Snodgrass, D.R., L.K. Nagy, D. Sherwood, and I. Campbell, 1982:
Passive immunity in calf diarrhea:
Vaccination with K99 antigen of ETEC and rotavirus.
Infect. Immun., August 1982, 586-591

85. Snodgrass, D.R., Smith, M.L., Krautil, F.L., 1982:
Interaction of rotavirus and enterotoxigenic E.coli in conventionally-reared dairy calves.
Vet. Microbiol. 7, (1), 51-60

86. So, M., H.W. Boyer, M. Betlach, and S. Falkow, 1976:
Molecular cloning of an Escherichia coli plasmid determinant that encodes for the production of heat-stable enterotoxin.
J. Bacteriolog. 128, 463-472

87. Sojka, W.J., C. Wray, and J.A. Morris, 1978:
Passive protection of lambs against experimental enteric colibacillosis by colostral transfer of antibodies from K99-vaccinated ewes.
J. Med. Microbiol. 11, 493-499

88. Ueda, H., Terakado, N., 1981:
Etiologic studies on enterotoxigenic E.coli among isolated from domestic animals in Japan.
Nat. Inst. Animal Health Quaterly, Japan 1981

89. Ueda, H., Terakado, N., Sekizaki, I. Hashimoto, K.,1982
Distribution of enterotoxigenic Escherichia coli in diarrheal calves and healthy cattles.
Jap. J. Vet. Science 44 (5), 751-757

90. Van Embden, J.D.A., F.K. de Graaf, L.M. Schouls, and J. S. Teppeme, 1980:
Cloning and expression of a deoxyribonucleid acid fragment that encodes for the adhesive antigen K99.
Infect. Immun. 29, 1125-1133

91. Wadström, T., Faris, A., J. Freer, D. Habte, D. Hallberg, and A. Ljungh, 1980:
Hydrophobic surface properties of enterotoxigenic E.coli with different colonization factors (CFA/I, CFA/II, K88 and K99) and attachment to intestinal epithelial cell.
Scand. J. Infect. Dis. (Suppl.) 24, 148-153

92. Wadström, T., C.J. Smyth, A. Faris, P. Jonsson, and J. H. Freer, 1979:
Hydrophobic absorptive and hemagglutinating properties of enterotoxigenic E.coli with different colonization factors:
K88, K99 and colonization factors and adherence factors.
In Proceedings of the Int. Symp. on Neonatal Diarrhea. Stuart Brandle Publishing Service, Edmonton, Canada

93. Woode, G. N., 1981:
Etiology of enteric viral infections in calves.
Vet. Microbiol. Preventive Med. College of Vet., Iowa State University Ames 5011, USA

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr danke ich vielmals für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. P. A. Bachmann danke ich sehr für die bereitwillige Beratung und Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil. G. Baljer möchte ich mich herzlich bedanken für die wissenschaftliche Betreuung und die großzügige Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit. Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern in seinem Labor für ihre stets freundliche Hilfe.

G LEBENSLAUF

Geboren:	am 16. Februar 1953 in Dietfurt/Altm.
Eltern:	Leonhard Gmelch, Land- und Gastwirt Therese Gmelch, geb. Ihrler
Schulbesuch:	1960 - 1966 Volksschule Dietfurt 1966 - 1973 Gymnasium Neumarkt/OPf.
Abitur:	08. Juni 1973, Gymnasium II, Neumarkt
Studium:	1977 - 1982 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Fachbereich Tiermedizin
Staatsexamen:	11. November 1982
Bestallung:	17. Dezember 1982
Tierärztliche Tätigkeit:	seit 1983 am Institut für Med. Mikrobiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München als Doktorand